



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

SYDIA DARCILA OLIVEIRA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIOATIVOS
À BASE DE QUITOSANA ADITIVADOS COM O EXTRATO DO RESÍDUO DE
ACEROLA**

Recife/PE
Agosto de 2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS



SYDIA DARCILA OLIVEIRA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIOATIVOS
À BASE DE QUITOSANA ADITIVADOS COM O EXTRATO DO RESÍDUO DE
ACEROLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Andrelina Maria Pinheiro Santos

CO-ORIENTADORA: Enayde de Almeida Melo

CO-ORIENTADORA: Cristiana Maria Pedroso Yoshida

Recife/PE
Agosto de 2015

Ficha Catalográfica

M149d Machado, Sydia Darcila Oliveira
Desenvolvimento e caracterização de filmes bioativos à base
de quitosana aditivados com o extrato do resíduo de acerola /
Sydia Darcila Oliveira Machado. – Recife, 2015.
101 f.: il.

Orientador(a): Andreлина Maria Pinheiro Santos.
Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Departamento de Economia Doméstica, Recife,
2015.

Referências.

1. Biopolímeros 2. Quitosana 3. Antioxidante 4. Embalagem
ativa 5. Acerola I. Santos, Andreлина Maria Pinheiro, orientadora
II. Título

CDD 640

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIOATIVOS
À BASE DE QUITOSANA ADITIVADOS COM O EXTRATO DO RESÍDUO DE
ACEROLA**

Por Sydia Darcila Oliveira Machado

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em __/__/__ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Glória Maria Vinhas
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Flávia Gonçalves Domingues Ferreira
Faculdade Boa Viagem

*Dedico a Deus, grande amigo, a Zélio e Finha, meus pais, a Rafa,
meu amor, a Chi e Aa, meus irmãos, e a Olga e Igor, meus sobrinhos!*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi fruto de muito esforço! Não surgiu do nada e, sozinha, não conseguiria chegar a realizá-lo. Por isso, com muita alegria quero fazer meus agradecimentos a todos que tornaram possível esta obra e me acompanharam nesta caminhada até a sua conclusão.

Em primeiro lugar tenho que agradecer a Deus. Pode parecer clichê esse agradecimento, mas na verdade é um reconhecimento por Aquele a quem senti sempre presente durante toda esta caminhada, que me ajudou com a inspiração e com todos os dons necessários para levar a bom termo esta missão. Obrigada, Senhor, por ser um Amigo tão bom!

Meus pais, minha fortaleza de sempre, a quem devo tudo nesta vida. Sua companhia, amizade, paciência e estímulo. Sem vocês nada disso teria sentido!

Ao meu namorado, Rafael, companheiro e incentivador de todas as horas.

Aos meus irmãos e sobrinhos, Olga e Igor, este trabalho é para vocês também, com toda certeza.

Às minhas orientadoras Lia Pinheiro, Enayde Melo e Kity Yoshida, com quem estive ombro a ombro na criação desta obra, lutando para superar os desafios e compartilhando as conquistas, assim como trabalhando unidas para que este estudo chegasse a ser tudo o que se tornou. Agradeço em especial à Lia pela confiança depositada desde o início, assim como sua compreensão e humanidade nos momentos mais necessários!

Não posso deixar de agradecer também a Camila Bitencourt, de São Paulo, pela imensa bondade e paciência ao compartilhar seus conhecimentos que ajudaram tanto neste trabalho.

A Andreia Ferreira, que ajudou desde Portugal (graças a “santa” internet!) de forma tão pronta e atenciosa.

Agradeço ao professor José Maurício dos Santos Filho e ao doutorando Magno Felipe Teixeira, da UFPE, que auxiliaram na parte prática que não conseguiria realizar sem suas valiosas e bondosas contribuições.

Aos meus colegas de turma do mestrado, pela amizade, companhia e estímulo a seguir adiante. Em especial à Jocelane, Tatiana e Fabiana, por todas as incontáveis horas juntas no laboratório, inclusive nos finais de semana. Que bom saber que posso contar com a amizade de pessoas tão extraordinárias!

Obrigada a Mariana Feitosa, por todo conhecimento passado e pela amizade que sempre demonstrou.

Também agradeço a Gisélia Muniz e Bruno Andrade pela companhia e auxílio desde antes de iniciar este mestrado.

Deixo meu muito obrigadatambém a professora Tânia Stamford pelo incentivo e apoio na época da seleção do mestrado.

Carla, Jaqueline e Rita, não esqueci de vocês, muito obrigada pela ajuda. Também à banca examinadora, que são aquelas pessoas que contribuem para um trabalho ser o que deve ser em sua publicação.

Assim agradeço infinitamente a todos! Sei que não foi possível escrever o nome de cada um, mas neste momento só posso dizer que a gratidão que sinto tampouco pode ficar confinado ao espaço dessas linhas, peço apenas que acreditem e aceitem a minha grande e eterna gratidão!

“Tem dia que a gente põe vírgula, tem dia que colocamos reticências, tem dia que colocamos ponto final e tem dia que temos a necessidade de virar a página.”

(Pe. Fábio de Melo)

RESUMO

As embalagens ativas são destinadas a prolongar a vida de prateleira dos alimentos embalados e preservar a sua qualidade, sendo importante considerar a matéria-prima selecionada para sua produção. É possível incorporar compostos bioativos nos filmes de quitosana, como antioxidantes naturais, formando um material com potencial para ser aplicado como embalagem ativa. O presente trabalho teve como objetivo adicionar antioxidantes naturais, extraídos de resíduos agroindustriais da acerola, em filmes preparados à base de quitosana com potencial aplicação como embalagens ativas de alimentos. Um delineamento central de composto rotacional (DCCR) foi utilizado com um modelo de ordem (2^3) contendo 6 pontos axiais (1,68) e 3 pontos centrais, totalizando 17 amostras. A partir desses ensaios, em que todos possibilitaram a formação de filmes, foi escolhida a melhor formulação de 1,32% de quitosana, 20mL do extrato do resíduo agroindustrial da acerola e 0,2% do plastificante para ser conduzida aos testes. Foi desenvolvido um filme caracterizado pela facilidade ao manuseio, por propriedades de barreira à luz, um forte potencial de sequestro do DPPH (maior que 80%) e suas propriedades mecânicas apresentaram valores de $T_R = 20,54 \pm 1,07 \text{MPa}$, $\epsilon_R = 9,11 \pm 0,13\%$ e $E = 445,52 \pm 2,33 \text{MPa}$. Os filmes desenvolvidos apresentaram características valiosas para a preservação do alimento, sendo necessários novos estudos para conhecer seu comportamento quando aplicado a algum alimento.

Palavras-chave: biopolímeros, quitosana, antioxidante, embalagem ativa

ABSTRACT

Active packaging is designed to extend the shelf life of packaged foods and preserving its quality, it is important to consider the raw material selected for its production. It is possible to incorporate bioactive compounds on chitosan films, such as natural antioxidants, forming a potential material to be applied as active packaging. This study aimed to add natural antioxidants from agroindustrial waste of acerola, films prepared in the chitosan base with potential application as active food packaging. A central design rotational compound (CCRD) was utilized as a model of order (23) containing 6 axial points (1.68) and three central points, totaling 17 samples. From these tests, all of which enabled the formation of films, was chosen as the best formulation of 1.32% chitosan, 20 ml of the agroindustrial residue acerola extract and 0.2% of plasticizer for tests to be conducted. It developed a film characterized by easy to handle, for light barrier properties, a strong potential for sequestration of DPPH (greater than 80%) and mechanical properties showed values $TR = 20.54 \pm 1,07\text{MPa}$, $\epsilon R = 911 \pm 0.13\%$ and $E = 445.52 \pm 2,33\text{MPa}$. Developed films presented valuable features for the preservation of food, requiring new studies to understand their behavior when applied to some food.

Keywords: biopolymers, chitosan, antioxidant, active packaging

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 01 - Estrutura química da quitina e da quitosana.....	21
FIGURA 02 - Esquema das aplicações da quitosana na indústria de alimentos.....	22
FIGURA 03 – Esquema geral da oxidação lipídica.....	33
FIGURA 04 - Estrutura química das principais classes de compostos fenólicos.....	37

ARTIGO 1

FIGURA 01–Esquema demonstrativo da seleção das amostras para as análises.....	54
FIGURA 02– Retenção dos fenólicos, capacidade de sequestro e parâmetros de cor dos dezessete ensaios.....	57
FIGURA 03– Filmes de quitosana com extrato antioxidante com diferentes graus de retenção, correspondendo aos ensaios: (A) Ensaio 01(RF=1,9±0,14 mg/g), (B) Ensaio 03 (RF= 4,4±0,08 mg/g), (C) Ensaio 04 (RF = 4,1±0,66 mg/g) e (D) Ensaio 12 (RF = 4,3±0,60 mg/g).....	59
FIGURA 04– Diagrama de Pareto para (A) Retenção de Fenólicos no Filme e (B) Capacidade Antioxidante para filmes de quitosana/antioxidantes, $p < 0,05$	61
FIGURA 05– Superfícies de respostas para (A) retenção de compostos fenólicos, (B) Capacidade de sequestro do radical DPPH, (C) e parâmetros de cor: Luminosidade, (D) a^* e (E) b^* em função da concentração de quitosana e de compostos fenólicos do extrato etanólico de acerola.....	62
FIGURA 06– Análise da retenção de fenólicos e da capacidade antioxidante	63

ARTIGO 2

FIGURA 01- a) filme de quitosana, b) filme de quitosana incorporado pelo extrato.....	78
FIGURA 02-ATR-FTIR: espectro de quitosana (A) e quitosana/extrato.....	86

FIGURA 03-Atividade de sequestro dos radicais livres do filme à base de quitosana incorporado com o extrato de resíduo agroindustrial.....	89
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Exemplos de filmes à base de macromoléculas naturais aditivados com compostos naturais.....	20
---	----

ARTIGO 1

TABELA 01 – Matriz do delineamento fatorial 23 - composto central rotacional (DCCR), níveis codificados e decodificados das variáveis, para obtenção filmes de quitosana e antioxidante obtido do extrato de resíduo agroindustrial	53
---	----

TABELA 02 – Retenção, DPPH, e análise de cor para os filmes de quitosana aditivados com antioxidantes.....	56
--	----

TABELA 03 – ANOVA para a resposta retenção de compostos fenólicos, capacidade de sequestro do radical DPPH e parâmetros de cor (L^* a^* b^*) de filmes de quitosana aditivado com extrato etanólico de acerola.....	60
---	----

ARTIGO 2

TABELA 01 – Atividade antioxidante dos filmes com concentrações diferentes do extrato e de quitosana.....	79
---	----

TABELA 02 – Espessura, densidade e umidade dos filmes à base de quitosana.....	80
--	----

TABELA 03 - Efeito da adição do extrato de resíduo agroindustrial na Luminosidade (L^*), croma a^* , croma b^* e da opacidade (O) nos filmes à base de quitosana	82
--	----

TABELA 04 – Interferência da adição do extrato na transmissão da luz (%T).....	84
--	----

TABELA 05 - Efeito da incorporação do extrato hidroetanólico do resíduo da acerola (EHRA) na tração na ruptura (TR), na elongação na ruptura (ER) e no módulo Young (E) dos filmes à base de quitosana	87
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

ATR-FTIR- Análise de infravermelho com transformada de Fourier

BHA- Butilhidroxianisol

BHT- Butilhidroxitolueno

DCCR-Delineamento Central de Composto Rotacional

DNA- cido desoxirribonucléico

DPPH-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

E- Módulo de Young

EGAE- Equivalentes de ácido gálico

EHRA- Extrato hidroetanólico do resíduo da acerola

ER- Elongação

L- Luminosidade

LMP-Limite máximo permitido

OP- Opacidade

PA- Potencial antioxidante

PG- Propil galato

RA- Resíduo agroindustrial

RCF- Retenção de compostos fenólicos

RF- Retenção de fenólicos

RNA_m- ácido ribonucléico

TBHG- Terc butil hidroquinona

TR- Tração na ruptura

UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Embalagens ativas	17
3.1.1 Biopolímeros na produção de filmes ativos	18
3.2 Quitosana.....	21
3.2.1 Desenvolvimento de filmes à base de quitosana	23
3.2.2 Propriedade antimicrobiana.....	26
3.2.3 Propriedade antioxidante	28
3.3 Resíduos agroindústrias como fonte de antioxidantes	30
3.4 Compostos fenólicos	35
3.5 Acerola	37
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ARTIGO 1	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Materiais.....	51
2.2 Obtenção dos extratos	51
2.3 Planejamento experimental e análise da superfície de resposta	52
2.4 Preparação dos filmes.....	53
2.5 Extração dos compostos presentes nos filmes.....	53
2.6 Determinação da atividade antioxidante	54
2.7 Parâmetro de cor.....	55
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	55
4. CONCLUSÃO	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ARTIGO 2	69
RESUMO	70
ABSTRACT	71

1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Materiais	73
2.2 Obtenção dos extratos	73
2.3 Seleção dos filmes	73
2.4Preparação dos filmes.....	74
2.5 Determinação da espessura, densidade e umidade	74
2.6Parâmetro de core opacidade.....	75
2.7 Transmissão de luz	75
2.8Análise de infravermelho com Transformada de Fourier.....	76
2.9 Propriedades mecânicas	76
2.10 Extração dos compostos dos filmes.....	76
2.11Determinação de fenólicos totais.....	76
2.12Determinação da atividade antioxidante	77
2.13Análise estatística	77
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	78
3.1 Seleção dos filmes	78
3.2Caracterização dos filmes ativos	79
3.3Parâmetro de cor e opacidade.....	81
3.4Transmissão de luz	83
3.5ATR-FTIR	85
3.6Propriedades mecânicas	86
3.7Cinética dos filmes	88
4. CONCLUSÃO	92
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100

1. INTRODUÇÃO

Diversos alimentos são suscetíveis à deterioração, principalmente pelo mecanismo da oxidação lipídica (IGLESIAS et al., 2012; BABBAR et al., 2011; BREWER, 2011; SOUZA et al., 2011), tais como, carne bovina, peito de frango (MIN, CORDRAY, AHN, 2011) e produtos derivados da carne (HUGO e HUGO, 2015), sardinha (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014), que pode conduzir à perda de qualidade sensorial e valor nutricional dos alimentos, além da produção de aldeídos tóxicos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; SAMPAIO et al., 2012; BABBAR et al., 2011; SUN-WATERHOUSE et al., 2011). Por essa razão, existe o interesse em inibir o mecanismo de oxidação e o desenvolvimento de materiais de proteção que retardem ou inibam essa alteração sendo uma alternativa para a preservação do alimento (REALINI e MARCOS, 2014).

As embalagens ativas, enriquecidas com substâncias antioxidantes, são desenvolvidas para interagir de forma desejável com o produto, ou seja, agregando valores nutricionais, melhorando sua segurança e propriedades organolépticas e alterando as condições de acondicionamento para estender sua vida comercial (LI et al., 2014; SOUZA et al., 2011).

A aplicação de antioxidantes ao produto ou a algum produto que o envolva, mostra ser uma estratégia de inibição dessa reação (LI et al., 2014; LUPO et al., 2014; WATERHOUSE et al., 2014; JAYASINGHE et al., 2013). Referente à atenção dada à segurança do produto destinado ao consumo, antioxidantes sintéticos, tais como o butilhidroxitolueno (BHT) e o butilhidroxianisol (BHA), têm seu uso restrito devido a possíveis efeitos cancerígenos, despertando cada vez mais o interesse por aditivos de fontes naturais, como por exemplo, os terpenos, ácidos fenólicos, carotenóides, tocoferóis e outras vitaminas (LI et al., 2014; KIM, CHO, HAN, 2013; SAMPAIO et al., 2012; SOUZA et al., 2011).

Os antioxidantes naturais são compostos bioativos que atuam neutralizando a reação de oxidação (LUPO et al., 2014), conferindo múltiplos benefícios à saúde, tanto por inibir ou interromper a oxidação, como por favorecer a prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (SUN-WATERHOUSE et al., 2011). Esses compostos podem ser extraídos de resíduos de frutas, porém são pouco aproveitáveis, e, considerando seus valores nutricionais e suas funcionalidades cresce o interesse no estudo desses compostos presentes nas frutas e extratos de plantas (LI et al., 2014). Além de

representar um aditivo de baixo custo, sendo favorável à economia e contribuindo com a sustentabilidade ambiental (BABBAR et al., 2011).

As embalagens, quando produzidas com matérias-primas derivadas do petróleo, representam um problema ambiental, pois, por não serem facilmente biodegradáveis, seus resíduos sólidos perduram muito tempo, repercutindo em um impacto negativo ao ambiente. Assim, a utilização de polímeros naturais como substitutos torna-se uma boa estratégia, como a quitosana, que apresenta fácil biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, sendo adequada para ser utilizada como matéria-prima para formação de filmes que podem ser utilizados como embalagens (CRUZ-ROMERO et al., 2013; LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012).

A quitosana é um polissacarídeo composto por ligações β -(1-4)-2-acetamido-D-glicose e β -(1-4)-2-amino-D-glicose, obtido a partir da desacetilação da quitina. A quitina é sintetizada por inúmeros organismos vivos, sendo o principal componente da parede de camarões e estando presente na parede de crustáceos, de fungos e de outros materiais biológicos e sua utilização é bastante promissora para indústria, pois são materiais subutilizados. É um biopolímero abundante da natureza, desempenhando papel de reforço estrutural nos organismos em que é encontrada (LECETA et al, 2015; THADATHIL e VELLAPAN, 2014; ELSABEE e ABDU, 2013; SIRIPATRAWAN e NOIPHA, 2012; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010).

Com o intuito de contribuir com uma maior rentabilidade econômica, com um menor impacto ambiental e com a preservação da saúde, esse estudo teve por objetivo o desenvolvimento de filmes ativos a partir de quitosana, incorporando composto ativo antioxidante obtido de resíduos de acerola, com potencial aplicação como embalagem ativa para alimentos. Os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual, parâmetros de cor e opacidade, propriedades de barreira à transmissão de luz, propriedades mecânicas, quantificação de fenólicos totais e atividade antioxidante.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

Uma das principais causas de deterioração dos alimentos é a oxidação, que acontece pela exposição dos alimentos a alguns fatores externos, como por exemplo luz e oxigênio. Por essa vulnerabilidade, destaca-se a necessidade de um sistema de proteção que retarde ou iniba esse mecanismo de deterioração, favorecendo a conservação do produto alimentício e estendendo seu período de comercialização.

As inovações tecnológicas vêm com o objetivo de desenvolver embalagens ativas, que interagindo diretamente com o alimento ou com os envoltórios, pode manter ou melhorar sua condição. Essas embalagens são incorporadas por aditivos que doam suas propriedades aos produtos, sendo um desafio a escolha desses componentes, pois os materiais sintéticos, ainda aplicados, estão sendo preteridos por prováveis efeitos prejudiciais à saúde pelo seu consumo. Soma-se ainda o fato das embalagens de polímeros sintéticos, derivadas do petróleo, apresentarem difícil degradabilidade, causando assim grande impacto ao meio ambiente.

Ademais do exposto, valorizando a preservação do ambiente e os cuidados com a saúde, preconiza-se a substituição tanto dos aditivos sintéticos, como das matérias-primas por produtos naturais, sendo eles: 1) resíduos agroindustriais, que são fontes de nutrientes e de compostos bioativos, entre eles pigmentos que podem auxiliar na proteção contra a luz, e 2) polímeros naturais, que apresentam características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, entre outras, tornando-os adequados para serem colocados em contato direto com o alimento. Alguns estudos mostram que esses dois materiais quando combinados, potencializam os efeitos positivos de cada um deles, porém mesmo com tantas características positivas e com valores bem definidos, ainda são materiais subutilizados.

Diante dos fatos apresentados, procura-se avaliar a possibilidade de utilização de recursos naturais para o desenvolvimento de um material com característica capaz de auxiliar na redução da deterioração dos alimentos, com aumento da vida comercial e, consequentemente, com a maior rentabilidade industrial.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Embalagens ativas

As inovações tecnológicas vêm sendo utilizadas no intuito de atender um consumidor cada vez mais exigente, com pouco tempo disponível para compra e preparo dos alimentos, associados a maior demanda de mercado com uma crescente distribuição desses produtos, tornando necessário o desenvolvimento de um sistema que proporcione o prolongamento da vida de prateleira do alimento, além de garantir a qualidade e segurança do seu consumo. As embalagens ativas e inteligentes surgem como uma alternativa para atender tais expectativas, tornando-se um desafio para as indústrias de embalagens (DAINELLI et al., 2008).

As embalagens ativas representam um conceito inovador de embalagens de alimentos, sendo uma tecnologia emergente em que um aditivo é incorporado ao material de embalagem diretamente ao produto alimentício com a finalidade de interagir com o alimento, atuando na liberação ou absorção de substâncias, podendo fornecer e/ou melhorar a funcionalidade, pois passa a conferir diferentes propriedades além da função de proteção, atuando na extensão da vida comercial do produto embalado (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; LÓPEZ DE DICASTILLO et al., 2013). Porém, a incorporação do aditivo diretamente no alimento apresenta limitações, visto que os compostos ativos são consumidos e neutralizados rapidamente, podendo cessar a proteção e conduzir a degradação dos alimentos em alta velocidade (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; MASTROMATTEO et al., 2010). Por isso, os compostos aditivados, na maioria das vezes, estão contidos em um material separado, como por exemplo em sachês, mas também podem ser administrados diretamente ao material de embalagem e atuam liberando de forma gradativa o composto para a superfície do alimento que é a região de maior vulnerabilidade aos agentes externos (DAINELLI et al., 2008).

Segundo o regulamento n.º 450/2009 (29/05/2009) da União Européia, a embalagem ativa apresenta uma atuação além da proteção aos alimentos e é definida como um sistema destinado a aumentar o prazo de validade dos alimentos ou a manter ou melhorar o estado dos alimentos embalados. Concebidas de forma a incorporar deliberadamente componentes que libertem substâncias para os alimentos embalados ou o ambiente que os envolve ou que absorvam tais substâncias desses alimentos ou do ambiente que os envolve.

Dainelli et al. (2008) haviam referido duas dificuldades para que as indústrias relutassem quanto ao desenvolvimento desses sistemas de embalagens: 1) o custo, por tratar-se de uma nova tecnologia e 2) a aceitação, pois os consumidores poderiam associar o menor prazo de validade a alimentos mais seguros. Porém, atualmente, o que vem sendo observado é que esse tipo de embalagem é de grande interesse para a tecnologia dos alimentos, pois além de atuar como barreira a fatores externos, atuam preservando o alimento e aumentando o tempo disponível para consumo (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; REALINI e MARCOS, 2014; WU et al., 2013) e comercialização (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014), gerando um impacto positivo para a economia.

3.1.1 Polímeros naturais na produção de filmes ativos

Um material de embalagem para alimentos é considerado adequado para garantir a segurança dos produtos embalados quando apresenta boas propriedades mecânicas, é inerte, não-tóxico, impermeável a microrganismos, para atender a sua função principal que é a de conservar os alimentos e preservá-los da degradação que o contato com fatores externos pode provocar (SUNG et al., 2013).

No entanto, as embalagens mais comercializadas atualmente são produzidas com materiais petroquímicos, que por não serem facilmente biodegradados, seus resíduos sólidos perduram na natureza por muito tempo e causam um impacto negativo ao ambiente (ELSABEE e ABDOL, 2013; SUNG et al., 2013). Dessa forma, vem aumentando o interesse no desenvolvimento de embalagens que sejam produzidas com materiais de fácil biodegradação e não-tóxicos (DANG e YOKSAN, 2015; NORONHA et al., 2014; ELSABEE e ABDOL, 2013; SUNG et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010).

Além de preservar o produto, espera-se que as embalagens contribuam com o prolongamento da sua vida de prateleira, melhore as condições do alimento e as características sensoriais, mantendo a segurança do produto, por isso torna-se vantajoso o desenvolvimento de sistemas de embalagens que venham a atender melhor essa expectativa (CRUZ-ROMERO et al., 2013; SUNG et al., 2013). Assim, com o propósito de atender as tendências de mercado, pela demanda por alimentos seguros e com potenciais benefícios à saúde, a elaboração de embalagens ativas produzidas com matéria-prima biodegradável, mostra ser uma tecnologia promissora para indústria de alimentos, para o ambiente e para o consumidor (JOUKI et al., 2014).

Os polímeros naturais, são matérias-primas com potencial para a substituição parcial dos materiais sintéticos, por apresentarem características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e por serem renováveis (SIRVIO et al., 2014), e ainda possibilitando atender a crescente expectativa da consciência ambiental (JOUKI et al., 2014). Exemplos desses polímeros são as proteínas (de origem animal e vegetal), os lipídios, os polissacarídeos e as gomas (JOUKI et al., 2014; SIRVIO et al., 2014; LECETA, GUERRERO e CABA, 2013; ELSABEE e ABDU, 2013; SUNG et al., 2013; NORAJIT et al., 2010), todos podem ser utilizados de forma isolada ou combinada na tentativa de melhorar suas propriedades, quando necessário (SANTACRUZ, RIVADENEIRA e CASTRO, 2015; JOUKI et al., 2014). Esses materiais possibilitam a formação de filmes e revestimentos comestíveis, que são conceituados, respectivamente, como uma camada fina, livres para consumo e que revestem os alimentos ou que são colocados como uma barreira para evitar a interação entre o alimento e o ambiente (JOUKI et al., 2014).

Os polímeros naturais, quando utilizados para o desenvolvimento de filmes comestíveis, aditivados com algum composto que possam agregar valores a sua funcionalidade, podem ser classificados com potencial ativo, e conseqüentemente, de substituição às embalagens ativas produzidas com materiais sintéticos (SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010). Alguns biopolímeros apresentam por si, propriedades antimicrobianas e antioxidantes, mas que podem ser intensificadas com a adição de outras fontes naturais (NORAJIT et al., 2010; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010). Como mostra o estudo de Cao et al. (2013) que investigaram o efeito da quitosana pura e misturada com extratos de alho, cebola e gengibre na conservação de carnes de porco, e que perceberam melhor potencial antioxidante e antimicrobiano na mistura.

Corroborando como outras pesquisas que também mostraram melhor funcionalidade quando tiveram seus filmes à base de polímeros naturais incorporados com algum aditivo natural (FERREIRA et al., 2014; BITENCOURT et al., 2014; WANG et al., 2013; WU et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010)

Na Tabela 1 pode-se observar alguns exemplos de utilização de substâncias bioativas incorporadas diretamente em filmes à base de macromoléculas naturais.

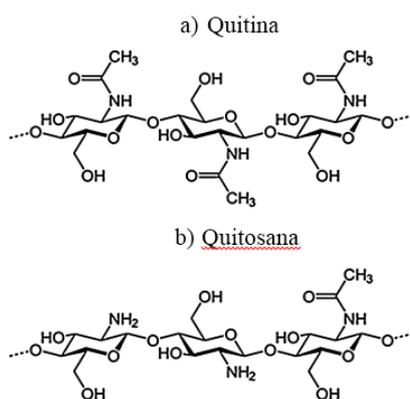
Tabela 1: Exemplos de filmes à base de macromoléculas naturais aditivados com compostos naturais.

Macromolécula	Composto ativo	Propriedade	Fonte
Quitosana	Extrato de chá verde	Antioxidante	SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010
Quitosana	Polifenóis de chá	Antioxidante	WANG et al., 2013
Quitosana	Extrato de gengibre, alho e cebola	Antioxidante e antimicrobiana	CAO et al., 2013
Alginato	Extrato de ginseng	Antioxidante	NORAJIT et al., 2010
Gelatina	Extrato de chá verde	Antioxidante	WU et al., 2013
Quitosana	Extrato de bagaço de uva	Antioxidante	FERREIRA et al., 2014
Gelatina	Extrato de chá verde, de semente de uva, de gengibre e da folha do ginkgo	Antioxidante	LI et al., 2014
Gelatina	Extrato etanólico de cúrcuma	Antioxidante	BITENCOURT et al., 2014
Quitosana	Óleos essenciais de limão, tomilho e canela	Antimicrobiana	PENG E LI, 2014
Alginato	Óleo essencial de orégano	Antimicrobiana	BENAVIDES et al., 2012
Mucilagem de sementes de marmelo	Óleo essencial de orégano	Antioxidante e antimicrobiana	JOUKI et al., 2014
Quitosana	Extrato de semente de uva e óleo essencial da <i>Zataria multiflora</i>	Antioxidante	MORADI et al., 2012
Quitosana	Extrato de groselha inidiana	Antioxidante	MAYACHIEW e DEVAHASTIN, 2010
Quitosana	Óleo essencial de alecrim	Antimicrobiana	ABDOLLAHI et al., 2012
Quitosana + hidroxipropilmetilcelulose	Óleos essenciais de laranja, limão e Melaleuca artemifolia (Árvore do Chá)	Antimicrobiana	SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011
Zeína + quitosana	Compostos fenólicos e ácidos dicarboxílicos	Antioxidante e antimicrobiana	CHENG et al., 2015
Quitosana	Óleo essencial de canela	Antimicrobiana	OJAGH et al., 2010

3.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo, classificado como material ecológico, composto por ligações β -(1-4)-2-acetamido-D-glicose e β -(1-4)-2-amino-D-glicose, obtido a partir da desacetilação da quitina. A quitina é obtida a partir de fontes naturais e sintetizada por inúmeros organismos vivos, sendo o principal componente da parede de camarões e estando presente na parede de crustáceos, de fungos e de outros materiais biológicos. Depois da celulose, é o polímero mais abundante da natureza, desempenhando papel de reforço estrutural nos organismos em que é encontrada (LECETA et al., 2015; THADATHIL e VELLAPAN, 2014; ELSABEE e ABDU, 2013; SIRIPATRAWAN e NOIPHA, 2012; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010). Na figura 1 é demonstrada a estrutura da quitina e da quitosana.

FIGURA 1-Estrutura química da a) quitina e b) quitosana



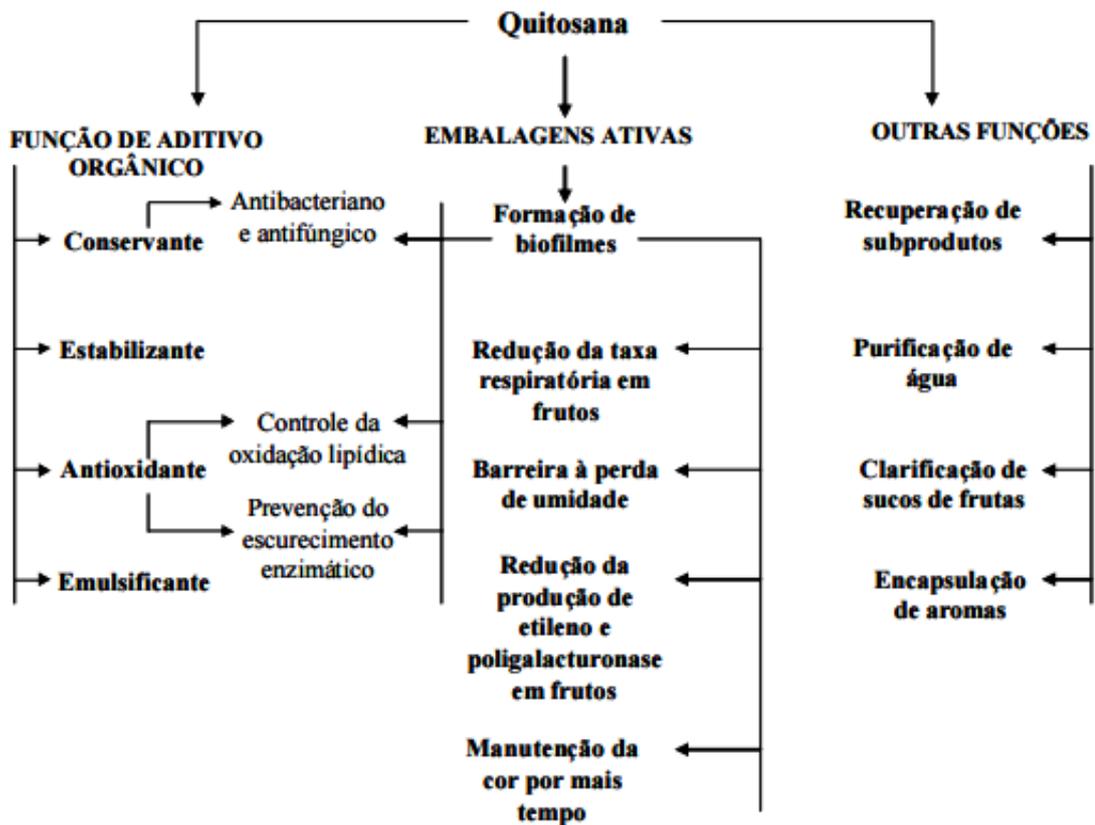
Fonte: VAN DEN BROEK et al., 2015

O processo para obtenção da quitosana é dividido em duas etapas: na primeira, ocorre a extração da quitina, por meio de uma solubilização de minerais, carbonato de cálcio e fosfato de cálcio, utilizando ácido clorídrico. Após essa etapa, as proteínas são isoladas pelo tratamento com hidróxido de sódio diluído, e após a lavagem e a secagem é obtido um material em forma de flocos, seguido por uma despigmentação para alcançar um produto incolor. Para a obtenção da quitosana, a quitina é submetida a um aquecimento com uma solução de hidróxido de sódio concentrada para hidrólise dos grupos *N*-acetil (ARANAZ et al., 2009; KURITA, 2006). A hidrólise desses grupos garante a presença de grupos amina livres, que apresenta facilidade em ser protonado em meio ácido, tornando a quitosana solúvel em soluções aquosas. O grau de desacetilação da quitosana varia entre 70 e 95% e

tanto ele quanto a cristalinidade das moléculas podem interferir na solubilidade em solventes comuns (LAVORGNA et al., 2010).

Devido às suas propriedades, a quitosana vem sendo estudada, pois são extremamente versáteis, conferindo aplicabilidade em diversas áreas: carreador de fármacos de liberação gradual, regeneração de tecidos epiteliais, confecção de membranas artificiais, absorção de gordura e redução do colesterol sérico, componente de cosméticos, agente floculante no tratamento de efluentes, agente antimicrobiano, formação de biofilmes, entre outros. A Figura 2, apresenta algumas maneiras de aplicação desse polímero na indústria de alimentos (FAI, STAMFORD e STAMFORD, 2008).

Figura 2- Esquema das aplicações da quitosana na indústria de alimentos.



Fonte: FAI, STAMFORD e STAMNFORD, 2008

3.2.1 Desenvolvimento de filmes à base de quitosana

A quitosana possui um grande potencial como material de embalagem pelas suas características de fácil biodegradabilidade, baixa toxicidade, o que a torna viável para ser colocada em contato com o alimento (PENG e LI, 2014; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010; WAHAB; ABDOU, 2010), apresentando também uma boa atividade antimicrobiana, atividade antioxidante e alta seletividade a gases (PENG e LI, 2014; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010), com efetiva barreira ao oxigênio (WANG et al., 2015; OJAGH et al., 2010; FAI, STAMFORD e STAMFORD, 2008) e dióxido de carbono (LECETA, GUERRERO e CABA, 2013; FAI, STAMNFORD e STAMFORD, 2008), além da capacidade de adsorção de diversos compostos (SOTO et al., 2011), tais como íons metálicos e compostos fenólicos (BHATNAGAR e SILLANPÄÄ, 2009).

Contrariamente a essas características, esse polímero não apresenta boa barreira ao vapor de água, o que limita sua aplicação em determinados alimentos (WANG et al., 2015; PERDONES et al., 2014; ELSABEE e ABDOU, 2013; OJAGH et al., 2010). O desempenho dessa propriedade pode ser influenciado pela natureza do polímero, os tipos de aditivos utilizados e pelo processo de preparação do filme (CHENG et al., 2015). As suas propriedades mecânicas são consideradas pobres quando comparadas a dos polímeros sintéticos, porém podem ser melhoradas com a utilização de plastificantes incorporados à sua estrutura (FERREIRA et al., 2014). A quitosana também pode ser utilizada com a finalidade de melhorar essas propriedades em outros polímeros naturais, como por exemplo, quando foi utilizada associada à película de gelatina, numa concentração quatro vezes menor, para melhorar a resistência à tração dos filmes produzidos, obtendo um aumento de 20 para 40 MPa (STAROSZCZYK et al., 2014).

Na maioria dos casos a eficiência da barreira ao vapor de água é uma propriedade desejada para filmes, para torná-lo apropriado no retardo da desidratação de produtos frescos (carne, frutas e legumes) e absorção de umidade em produtos secos (pós, massas secas e outros). E a barreira ao oxigênio permite o controle do amadurecimento de frutas ou auxilia significativamente na redução da oxidação de alimentos sensíveis a esse gás e na rancidez de gorduras poli-insaturados (DUTTA et al., 2009). Leceta, Guerrero e Caba (2013) perceberam que com a adição do plastificante houve uma maior mobilidade entre as moléculas do filme de quitosana, conduzindo a uma maior difusividade do oxigênio. Porém, quando comparado a embalagens utilizadas comercialmente, os resultados de barreira foram

ainda melhores. Em relação à interferência da luz, esta pode ser consideravelmente reduzida com a incorporação de pigmentos ao filme (DUTTA et al., 2009).

A quitosana na forma de filme, tem revelado eficiência a nível laboratorial, para conservar vários tipos de alimentos como: ovos, frutas, vegetais, carnes (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010), e queijos (DI PIERRO et al., 2011; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010). De um modo geral, os filmes de quitosana são biodegradáveis, biocompatíveis, flexíveis, duráveis, difíceis de quebrar e também inibem o crescimento microbiano (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010).

Pelas suas propriedades de biodegradabilidade, não toxicidade, biocompatibilidade, propriedade antimicrobiana, a quitosana tem despertado bastante interesse em diversos ramos industriais (AIDER et al., 2010; ARANAZ et al., 2009). Além dessas características, também são referidas outras, tais como efeito hipocolesterolêmico (ANRAKU et al., 2011; ARANAZ et al., 2009; KASSAI, 2009; PARK et al., 2004; SUGANO et al., 1988), hemostático, analgésico (ARANAZ et al., 2009), antitumoral (ARANAZ et al., 2009; CHIEN et al., 2007; PARK et al., 2004) e atividade antioxidante (ANRAKU et al., 2014; ANRAKU et al., 2011; ARANAZ et al., 2009; CHIEN et al., 2007) e que a maioria dessas propriedades biológicas estão relacionadas com a estrutura catiônica do polímero (ARANAZ et al., 2009).

Anraku et al. (2011) estudando o efeito antioxidante da quitosana de alto peso molecular, em humanos voluntários e saudáveis, perceberam atuação na circulação sistêmica, com efeito na redução do colesterol e aumento da resistência ao estresse oxidativo. Sugerindo que a quitosana liga-se fortemente ao LDL-colesterol, podendo reduzir níveis de pró-oxidantes, tais como colesterol inibindo assim o desenvolvimento subsequente do estresse oxidativo na circulação sistêmica. Anraku et al. (2014) estudaram o efeito de suplementos de quitosana sobre o estresse oxidativo e de fatores relacionados nos pacientes em hemodiálise para entender melhor o papel desse polímero como um antioxidante na circulação sistêmica, e relacionaram a atuação da quitosana como antioxidante, sugerindo uma atividade indireta do biopolímero, em que os componentes oxidativos seriam absorvidos no trato gastrointestinal suprimindo assim, os níveis séricos dos pró-oxidantes.

No entanto, a quitosana é de interesse não só devido às suas importantes propriedades, mas também devido à presença do grupo funcional amina, que pode ser apropriadamente modificado para a produção de materiais mais funcionais, obtendo-se, por

reações químicas de acetilação, quaternização, alquilação, reticulição (“grafting”), reações com aldeídos e cetonas (para originar bases de Schiff), ou com agentes quelantes de metais, que podem proporcionar modificações químicas para obtenção de uma diversidade de produtos com propriedades mais avançadas e funções biológicas mais bem definidas (PILLAI, PAUL e SHARMA, 2009).

Os grupos hidroxila funcionais também têm a sua importância e podem ser utilizados em diversas reações de modificação da quitosana como a o-acetilação, ligação-H com átomos polares, “grafting”, entre outras (PILLAI, PAUL e SHARMA, 2009). Na reação do grafting ligam-se determinados compostos ao polímero de quitosana de forma a melhorar uma propriedade específica como por exemplo a ligação de compostos fenólicos (WANG et al., 2013) ou de óleo essencial de canela (PERDONES et al., 2014) para melhorar a capacidade antioxidante ou antimicrobiana.

O grau de desacetilação é uma característica estrutural que também pode influenciar propriedades biológicas, mecânicas e físico-químicas do polímero (DIMZON e KNEPPER, 2015), que quando utilizado para produção do filme, pode apresentar alterações nas propriedades de resistência e elasticidade, além das características anteriormente referenciadas, podendo também sofrer influência do seu peso molecular, da sua concentração e solubilidade (PENG e LI, 2014; LECETA, GUERRERO e CABA, 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010). Existem variáveis experimentais importantes que devem ser levadas em consideração quando se trabalha com soluções de quitosana, principalmente por ser um polímero que pode ser destinado a vários setores industriais (DIMZON e KNEPPER, 2015; ARANAZ et al., 2009).

No geral, esse polímero é insolúvel em água, álcalis e solventes orgânicos, porém, quando sua desacetilação é maior que 50% (LECETA, GUERRERO e CABA, 2013), passa a ser solúvel em soluções aquosas com ácidos orgânicos que apresentem pH inferior a 6, tais como ácido acético, ácido fórmico e láctico (DANG e YOKSAN, 2015). Essa restrição de solubilidade a meios acidificados é devido à rede de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na molécula, o que pode limitar a sua aplicação (LIU et al., 2013). E a solubilidade torna-se possível devido à protonação dos grupos amino livres da posição C₂ da unidade repetitiva da glicosamina, resultando em uma carga positiva e a solubilidade da quitosana vai ser dependente do número de grupos *N*-acetil presentes na cadeia polimérica

(DE ALVARENGA, OLIVEIRA e BELLATO, 2010; ARANAZ et al., 2009; PILLAI, PAUL e SHARMA, 2009).

A biodegradabilidade, a capacidade de adsorção e de reação da quitosana, assim como a solubilidade são dependentes da quantidade de amins protonadas (DE ALVARENGA, OLIVEIRA e BELLATO, 2010). A solubilidade é uma das características que está relacionada com a biodegradabilidade da quitosana (PENG e LI, 2014), e por ser complexa é bastante difícil de ser controlada, sendo dependentes do grau e do método de desacetilação (PILLAI et al., 2010).

3.2.2 Propriedades antimicrobianas

Há mais de duas décadas a atividade antimicrobiana da quitosana vem sendo estudada por ser considerada eficaz contra diversas bactérias, fungos filamentosos, leveduras (KONG et al., 2010; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010) e vírus (DI PIERRO et al., 2011). Mostrando um grande espectro na morte de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas com menor grau de toxicidade em células de mamíferos (KONG et al., 2010). Por essa sua propriedade, a quitosana vem sendo largamente utilizada para conservação de produtos cárneos (CAO et al., 2015).

O mecanismo de ação dessa atividade tem sido bem estudado, e alguns modelos têm sido propostos. Primeiramente é considerada a interação eletrostática entre moléculas policatiônicas da quitosana e a carga negativa dos componentes das membranas da parede celular bacteriana, levando a um deslocamento de constituintes da membrana do microrganismo (lipopolissacarídeos e proteínas), interferindo na troca de nutrientes entre o exterior e o interior das células, com perda de organelas celulares, despolarização das membranas celulares, e rompimento da integridade das ligações moleculares conduzindo à morte celular (VAN DEN BROEK et al., 2015; ELSABEE e ABDU, 2013; KRAJEWSKA, WYDRO e JAŃCZYK, 2011; MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010; OJAGH et al., 2010; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010), portanto quanto maior a densidade positiva, mais interações eletrostáticas se darão entre o polímero e o microrganismo, mostrando uma maior eficácia antimicrobiana (KONG et al., 2010).

Uma outra possibilidade seria o poder de penetração da quitosana através da parede celular para o interior das células, ligando-se ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e interferindo na síntese de ácido ribonucléico (RNA), então quanto menor for o polímero

de quitosana, maior é a facilidade de penetração na parede e no núcleo. E por fim, acredita-se que algumas propriedades como a desidratação, a gelificação, a inibição enzimática e as propriedades floculantes da quitosana podem estar envolvidas na ação antimicrobiana (KRAJEWSKA, WYDRO e JAŃCZYK, 2011). Esse polímero é reconhecidamente bacteriostático (inibe o crescimento bacteriano) e bactericida (poder de eliminar bactérias) (KRAJEWSKA, WYDRO e JAŃCZYK, 2011). E a eficácia da ação antifúngica e antibacteriana da quitosana pode sofrer interferência de fatores intrínsecos e extrínsecos, levando os resultados à dependência desses (KHOSHGOZARAN-ABRAS et al., 2012; AIDER, 2010; KONG et al., 2010; ARANAZ et al., 2009).

A quitosana, mesmo com um largo espectro de atividade antimicrobiana, apresenta diferentes formas de inibição de microrganismos a depender da espécie. Nos fungos, atua suprimindo a germinação de esporos e a esporulação, enquanto que a ação antibacteriana diferencia-se entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelas diferentes superfícies celulares de ambas, dando uma maior complexidade a ação (KONG et al., 2010). É referenciado que bolores e leveduras são mais sensíveis à ação da quitosana, quando comparadas às bactérias (AIDER, 2010).

Perdones et al. (2014) observaram que o revestimento à base de quitosana foi capaz de reduzir significativamente a taxa de degradação de morangos pela ação de fungos. Gómez-Estaca et al. (2010) relataram que, quando uma película a base de gelatina e quitosana incorporada com o óleo essencial de cravo foi aplicada na superfície de bacalhau o período de armazenamento sob refrigeração, o crescimento de bactérias Gram-negativas foi drasticamente reduzido, especialmente de enterobactérias.

O potencial antimicrobiano do polímero pode sofrer influência do seu grau de desacetilação e do peso molecular (CAO et al., 2013). Em relação ao pH o potencial antimicrobiano da quitosana aumenta conforme esse parâmetro diminui, e tem sido sugerido que a carga positiva do grupo amina (NH_3), a valores de $\text{pH} < 6,3$, transporta 50% da carga total de eletricidade, permitindo a interação com a carga negativa das membranas das células microbianas, podendo conduzir à fuga de componentes intracelulares (AIDER, 2010). Quando o pH é superior ao pKa, ao invés do efeito eletrostático, os efeitos hidrofóbicos e quelantes passam a ser responsáveis pela atividade antimicrobiana, pois a quitosana apresenta um efeito inibitório maior em pH ácido, que pode ser devido à presença de poucas cargas positivas do grupo amina em pH 7, pois a quitosana torna-se policatiônica com o pH abaixo do

pKa molécula(6,3-6,5), como também pela fraca solubilidade desse polímero em pH que não é ácido (KONG et al., 2010).

A temperatura também constitui um fator ambiental importante, No et al. (2006) estudaram o efeito das diferentes condições de armazenamento, do peso molecular das moléculas de quitosana, e em relação à temperatura, em quatro tipos de bactéria, sendo duas gram-negativas e duas gram-positivas. Cada bactéria foi inoculada numa solução contendo 0,05% (m/v) de quitosana, que tinham sido armazenadas tanto a 4^oC como a 25^oC, incubadas a 37^oC em constante agitação (100rpm) durante 24 horas e observaram que a bactéria *Listeria monocytogenes* foi completamente suprimida pela quitosana independente do tempo e temperatura de armazenamento, enquanto que a solução de quitosana armazenada a 25^oC mostrou uma maior atividade bactericida contra a *Salmonella enteritidis*.

Ação da quitosana também pode ser influenciada pelo seu estado físico. De maneira geral, a quitosana solúvel e os seus derivados são mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano. Em comparação com a quitosana solúvel, a quitosana em estado sólido apenas entra em contato com a solução através da superfície, apresentando uma ação antimicrobiana inferior (KONG et al., 2010).

3.2.3 Atividade antioxidante

A propriedade antioxidante da quitosana, pode ser melhorada com a adição de substâncias que tenham essa propriedade (WANG et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010). Khare, Biswas e Sahoo (2014) investigaram o efeito antioxidante da quitosana, do eugenol, do óleo essencial de pimenta e hortelã e do EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) sob a estabilidade oxidativa de uma preparação de macarrão com frango. Para a elaboração do macarrão, a carne de frango foi dividida em cinco porções, sendo que a quitosana e o EDTA foram colocados diretamente na massa, enquanto que o eugenol e o óleo essencial de pimenta e hortelã, substituíram parte do óleo dos ingredientes. As amostras foram armazenadas durante 2 meses sob temperatura e umidade relativa controladas (35±2^oC e 70%) e em intervalos de 15 dias, eram analisadas à eficiência antioxidante dos componentes naturais. Como conclusão perceberam que o tratamento com o eugenol foi o que mostrou melhor potencial como conservante natural na preservação da preparação por um período mais prolongado. E embora esse óleo essencial tenha mostrado melhor resultado, todos os outros tratamentos também mostraram ação antioxidante.

Os autores desse mesmo trabalho, referiram que a atividade antioxidante da quitosana pode ser devida à reação dos radicais livres e o grupo amino livre residual, formando moléculas de radicais estáveis, sugerindo à ação dos nitrogênios nos radicais livres. Quanto à ação antioxidante do eugenol, acreditam ser devido aos compostos fenólicos presentes em sua composição e a ação do EDTA seria pelo potencial em quelar íons metálicos.

Estudos realizados com a quitosana revelaram que essa atividade pode sofrer influência do peso molecular e do grau de desacetilação. Park et al. (2004) avaliaram a influência do grau de desacetilação da quitosana (50%, 75% e 90%) na atividade antioxidante desse material e perceberam que o maior percentual de sequestro do radical DPPH e superóxidos foi mostrado pelo polímero com mais alto grau de desacetilação (90%) quando utilizada uma mesma concentração do biopolímero e sugeriram que esse efeito poderia estar associado com a presença do nitrogênio na posição C₂ da molécula de quitosana. Khare, Biswas e Sahoo (2014) também referiram que esse polímero com maior grau de desacetilação apresenta um maior potencial de sequestro.

Chien et al. (2007) analisando a ação antioxidante de diferentes pesos moleculares da quitosana (baixo, médio e alto) em sumos de maçã, verificaram que o melhor efeito foi do polímero de menor peso molecular tanto no sequestro de radicais de DPPH, peróxido de hidrogênio e superóxido.

Além disso, foi colocada a hipótese de que tanto os grupos amino, como os grupos hidroxila, contribuem para a sua capacidade antioxidante total, por reagirem com radicais superóxidos, conduzindo assim o efeito de sequestro da quitosana. Esse efeito pode ser devido à reação entre os radicais livres e o residual grupo amino livres para formar radicais de macromoléculas estáveis (KHARE, BISWAS e SAHOO, 2014; CASETTARI et al., 2012). No entanto, alguns estudos têm concentrado a sua atenção na ligação à matriz da quitosana de outros compostos, para melhorar as suas propriedades antioxidantes e promover a sua aplicabilidade.

A derivatização da quitosana com grupos fenólicos é uma das possibilidades mais exploradas para aumentar a atividade antioxidante do polissacarídeo (CASETTARI et al., 2012). Os compostos fenólicos são conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes, principalmente porque podem atuar como captadores de radicais livres uma vez que os grupos hidroxilo podem doar um elétron ou um átomo de hidrogênio a um radical livre (PAZ

et al., 2015; NUNES et al., 2013). Por outro lado, a quitosana tem a capacidade de quelar íons metálicos envolvidos na catálise de reações oxidativas. Portanto, a introdução de grupos fenólicos na estrutura de quitosana permite a obtenção de uma nova matriz com os dois tipos de propriedades antioxidantes (NUNES et al., 2013).

A quitosana também exibe propriedades antioxidantes devido à sua capacidade de formar complexos com muitos metais de transição (KOSARAJU et al., 2010). Podendo atuar como quelantes de íons ferrosos e assim retardar a oxidação lipídica, pela eliminação da sua atividade pró-oxidante ou da sua conversão em íon férrico (ARANAZ et al., 2009). Desta forma, a quitosana pode contribuir com o prolongamento do tempo de prateleira dos alimentos, como mostrou o estudo de Khare, Biswas e Sahoo (2014).

3.3 Resíduos agroindustriais como fonte de antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais são compostos bioativos que atuam neutralizando a reação de oxidação (LUPO et al., 2014). Esses compostos podem ser representados pela vitamina C, pelos carotenóides, principalmente o β -caroteno e o licopeno, pela vitamina E, pelas antocianinas, flavonóides e outros compostos fenólicos. Alimentos contendo esses componentes contribuem com a prevenção de várias doenças crônicas não-transmissíveis (DA SILVA et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2014).

O organismo para manter seu metabolismo normal, absorve oxigênio tendo como metabólitos espécies reativas de oxigênio (EROS), que quando produzidos em excesso podem provocar prejuízos ao corpo humano, favorecendo o desenvolvimento de algumas doenças, entre elas doenças de caráter degenerativo (MOO-HUCHIN et al., 2014; BABBAR et al., 2011). Para inativá-los ou inibir sua atuação, torna-se necessário uma fonte exógena de compostos antioxidantes, pois a quantidade produzida intrinsecamente não é capaz de atender as necessidades do organismo (MOO-HUCHIN et al., 2014).

Esses compostos podem ser facilmente obtidos a partir de frutas e hortaliças e dos seus resíduos (cascas e sementes), que representam em torno de 25 a 30% dos vegetais (AYALA-ZAVALA et al., 2010), que geralmente são descartados ou subutilizados (DA SILVA et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2014; BABBAR et al., 2011), como resíduo de pouco valor (MOO-HUCHIN et al., 2015). Caetano et al. (2011) relataram o desperdício de resíduos de frutas no Brasil, pelas indústrias de sucos de fruta e exemplificaram que a indústria de acerola para processar 18 mil toneladas de suco e polpa, utilizava 34,40 mil

toneladas, equivalente a 7,16% das frutas processadas, gerando uma grande quantidade de resíduos, que muitas vezes se tornava uma fonte de poluição ao meio ambiente.

O ambiente pode sofrer agressão pela elevada composição orgânica dos resíduos, como pelo fósforo e nitrogênio, tendo em seu descarte no meio ambiente um precursor de sérios problemas, devido à liberação excessiva de compostos bioativos, que pode causar eutrofização de ambientes aquáticos, com conseqüente diminuição de oxigênio dissolvido, podendo causar a morte de organismos aeróbios, repercutindo com o desequilíbrio do ecossistema local (PELTZER et al., 2008).

Os resíduos, quando aproveitados, além ser positivo para o desenvolvimento sustentável e para a economia (BABBAR et al., 2011; AYALA-ZAVALA et al., 2010), pois são baratos e facilmente disponíveis (MOO-HUCHIN et al., 2015) atuam favorecendo a saúde e fornecendo uma substancial contribuição para a nutrição humana, por serem reconhecidamente fontes de moléculas bioativas e de nutrientes (MOO-HUCHIN et al., 2015; DA SILVA et al., 2014). Muitas frutas da época são processadas para elaboração de produtos secos, sucos, geléias, néctares, compotas, entre outros e os principais subprodutos de tal processamento são a casca e a semente, que pode ter um maior valor nutricional quando comparados à fruta inteira (MOO-HUCHIN et al., 2015; MOO-HUCHIN et al., 2014).

Da Silva et al. (2014) quantificaram e compararam os principais compostos bioativos encontrados em celulose e subprodutos comercializados que estão presentes nas frutas tropicais do Brasil. E concluíram que a utilização de resíduos agroindustriais, originados de frutas, apresenta um impacto positivo para economia, na redução de custos; para o ambiente por serem recursos renováveis e pelo seu alto valor como fontes de compostos bioativos, podendo ser utilizados pela indústria alimentícia e farmacêutica. Nesse contexto, a exploração plena das frutas e verduras implica em benefícios para o agronegócio e para o meio ambiente (AYALA-ZAVALA et al., 2010).

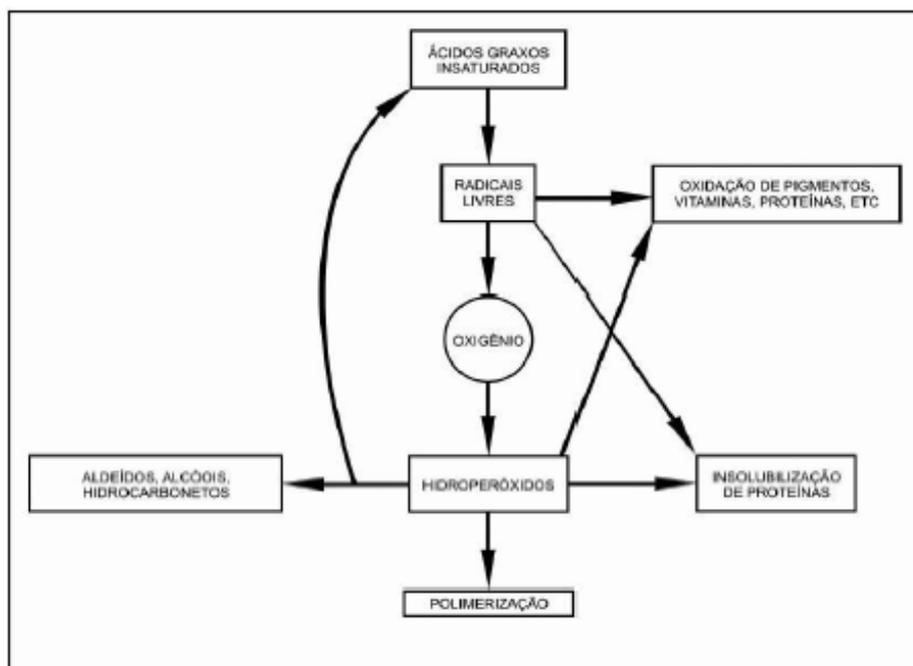
Em agosto de 2010, foi aprovada a Política Nacional de Resíduos Sólidos, apresentando como um dos objetivos a proteção da saúde pública e da qualidade ambiental, definindo como resíduos industriais aqueles que são oriundos dos processos produtivos e das instalações industriais, que podem ser utilizados como matérias-primas para pesquisas com compostos bioativos. E tendo como um dos princípios e objetivos, o reconhecimento do

resíduo sólido reutilizável e reciclável como um bem econômico e de valor social, gerador de trabalho e renda, visando ao desenvolvimento sustentável (BRASIL, 2010).

O sistema de ação desses substratos como antioxidantes, se dá como agentes quelantes, impedindo a oxidação lipídica ou bloqueando sua reação em cadeia, e consequentemente protegendo o organismo e o alimento de possíveis agressões sofridas pelos metabólitos que podem ser produzidos (LUPO et al., 2014; SOUZA et al., 2011; MEZADRI et al., 2008).

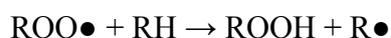
A oxidação lipídica é uma das principais causas de degradação dos alimentos, causando alterações das proteínas das carnes, da sua coloração, dos lipídios, principalmente em alimentos que tenham sua estrutura insaturada, e isso pode levar a alterações desagradáveis nas características organolépticas e nutricionais dos alimentos (DA SILVA et al., 2014; NORONHA et al., 2014; SHAH, BOSCO e MIR, 2014; SAMPAIO et al., 2012; BABBAR et al., 2011). Além de possibilitar a liberação de produtos tóxicos, nocivos ao homem, originados do seu metabolismo, alterando a segurança no consumo do produto alimentício (DA SILVA et al., 2014; NORONHA et al., 2014; SAMPAIO et al., 2012). Atoui et al. (2005) relataram a documentação dos radicais livres como precursores de catarata, disfunção cerebral, declínio do sistema imunológico, doenças degenerativas e envelhecimento precoce. A Figura 3 retrata o esquema geral da oxidação lipídica.

Figura 3- Esquema geral da oxidação lipídica



Fonte: JADHAV et al, 1996

O mecanismo de oxidação acontece em três etapas: iniciação, propagação e terminação. O processo de iniciação consiste na abstração do hidrogênio de um ácido graxo para a formação de um radical alquil (R^\bullet), que uma vez formado, estabiliza o radical livre conduzindo o deslocamento da ligação dupla, produzindo ligações duplas nas configurações *cis* ou *trans*. A etapa de propagação, envolve a adição de oxigênio ao radical alquil, sendo o radical resultante conhecido como radical peroxil (ROO^\bullet). A energia elevada desses radicais permite que eles promovam a captura de hidrogênio de outra molécula, conseqüentemente a adição de hidrogênio ao radical peroxil, repercutindo na formação de um hidroperóxido de ácido graxo ($ROOH$) e na formação de novos radicais alquil em outros ácidos graxos. E por fim, a terminação descreve a combinação de dois radicais para a formação de espécies não radicais, (PERUMALLA e HETTIARACHCHY, 2011), como o modelo proposto:





Onde: RH- Ácido graxo insaturado; R●- Radical livre; ROO●- Radical peróxido; ROOH- Hidroperóxido.

A atividade antioxidante de um composto, que refere-se ao retardo ou inibição da reação em cadeia na fase de iniciação ou de propagação, com a formação de radicais estáveis (PERUMALLA e HETTIARACHCHY, 2011), pode não ser a mesma em determinadas situações, pois está associada à origem do sistema lipídico, à configuração geométrica do antioxidante, das condições de armazenamento do produto e da forma aplicada para análise. Algumas técnicas com a finalidade de atuação de antioxidantes podem ser aplicadas aos alimentos para o controle da oxidação dos lipídios, entre elas: 1) o controle dos substratos provenientes da oxidação, 2) o controle de pró-oxidantes e 3) a adição de antioxidantes que agem impedindo a atividade das EROS (JAYASINGHE, GOTOH e WADA, 2013). Os mecanismos de ação dos antioxidantes podem ser pelo sequestro dos radicais; pela quebra da reação em cadeia; pela decomposição dos peróxidos; pela diminuindo da concentração de oxigênio catalisadores localizadas na cadeia de ligação da iniciação, tais como íons metálicos (HUGO e HUGO, 2015; SHAH, BOSCO e MIR, 2014)

O controle do progresso da oxidação de lipídios pode ser por meio do controle da perda de reagentes iniciais (oxigênio, lipídios, antioxidante), pela formação dos produtos intermediários (hidroperóxido, dieno conjugado) e pela formação de produtos finais (álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas, voláteis) (JAYASINGHE, GOTOH e WADA, 2013).

A aplicação dos antioxidantes aos alimentos ou às embalagens mostra ser uma maneira de prevenção da degradação dos produtos alimentícios, existindo atualmente uma tendência de utilização dos antioxidantes naturais, visto que os de origem sintética estão sendo preteridos devido a sua toxicidade e potencial carcinogênico (HUGO e HUGO, 2015; LI et al., 2014; WU et al., 2013; LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012; SAMPAIO et al., 2012; SOUZA et al., 2011), além dos benefícios que os componentes naturais podem oferecer à saúde (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012). Consequentemente, vem aumentando o interesse da indústria de alimentos na utilização desses compostos provenientes de produtos naturais (SOUZA et al., 2011; MEZADRI et al., 2008), bem como de outros setores

industriais, como o farmacêutico, cosmético (MOO-HUCHIN et al., 2014; PESCHEL et al., 2006), têxtil (ISLAM, SHAHID e MOHAMMAD, 2013), entre outros.

3.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários de plantas mais amplamente distribuídos no reino vegetal. A sua estrutura é composta por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas e apresentam mais de oito mil estruturas conhecidas, variando de moléculas simples (ácidos fenólicos), a moléculas altamente polarizadas (taninos), na Figura 4 encontra-se a estrutura de alguns compostos (LEOPOLDINI, RUSSO e TOSCANO, 2011; DAI e RUSSELL, 2010). Os compostos fenólicos podem ser classificadas de acordo com o número de átomos de carbono e estrutura, apresentando uma elevada diversidade molecular, mas essa classificação pode também ser de acordo com a sua origem, a partir da síntese química e da biossintética das vias naturais (SOTO et al., 2011).

De acordo com o número de subunidades fenólicas, são classificados em polifenóis e fenóis simples. Os fenóis simples incluem os ácidos fenólicos, enquanto que os polifenóis incluem os flavonóides, os estilbenos, e os compostos que têm três ou mais subunidades de fenol, os conhecidos taninos. Os ácidos fenólicos são fenóis que possuem um ácido carboxílico podendo formar as estruturas hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos. Os flavonoides são polifenóis compostos por um grande grupo de peso molecular baixo. Os taninos são divididos em dois grupos, o condensado e o hidrolizável. Os condensados são polímeros de flavonóides, e os hidrolisáveis contém ácido gálico, ou compostos semelhantes, esterificados com um hidrato de carbono. Por fim, os estilbenos família inclui vários compostos, entre os quais o resveratrol, composto presente na uva (LEOPOLDINI, RUSSO e TOSCANO, 2011).

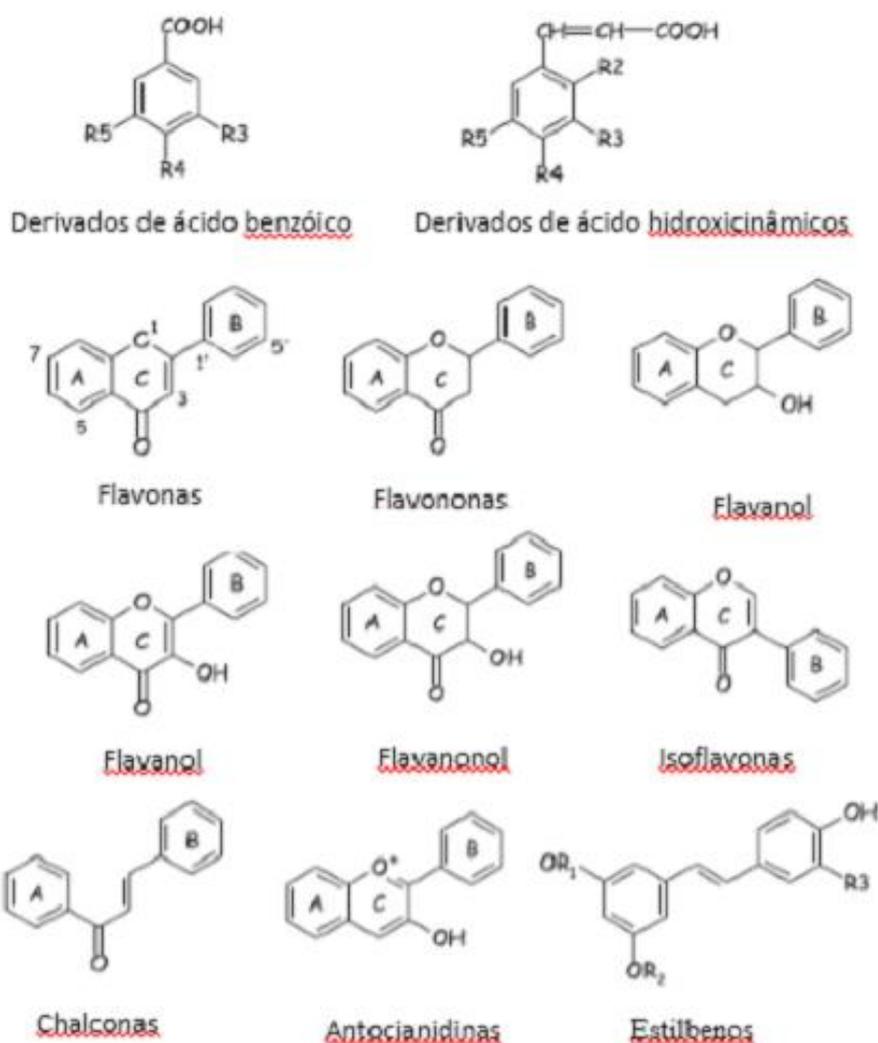
Os fenólicos são constituintes de alimentos e bebidas de origem vegetal (chocolate, frutas, legumes, cereais, chá, café, vinho) e contribuem, em parte, com algumas de suas características organolépticas, como sabor e cor (SOTO et al., 2011; DAI e RUSSELL, 2010), adstringência e amargura (SOTO et al., 2011). Além disso, também são responsáveis por funções estruturais e de proteção em plantas (LEOPOLDINI, RUSSO e TOSCANO, 2011). A classificação quanto aos níveis de compostos fenólicos presentes podem ser da seguinte maneira: 1) baixo, quando seus valores são menores que 500 mg de ácido gálico/100g; 2) intermediário, valores entre 500 e 2.500 mg de ácido gálico/100g e 3) alto, quando os valores estão acima de 2.500 mg de ácido gálico/100g (PAZ et al., 2015).

Os compostos fenólicos estão presentes tanto em partes comestíveis, comonanas não comestíveis das plantas, sendo um dos compostos bioativos mais conhecidos, por proporcionarem benefícios à saúde e essa função pode estar relacionada com sua capacidade de atuar como agente quelante de metais, de inibir a lipoxigenase e sequestrar os radicais livres (BABBAR et al., 2011). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é devida à sua estrutura que possibilita a atuação como agentes redutores, doador de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete, sendo capazes de estabilizar ou de desativar os radicais livres evitando danos a células estruturais (PAZ et al., 2015), representando uma boa alternativa de substituição dos antioxidantes sintéticos (SHAH et al., 2014). No entanto, as propriedades biológicas dos fenólicos vão além do seu potencial antioxidante (SOTO et al., 2011).

Seus benefícios à saúde vêm sendo bastante explorados na literatura por oferecerem proteção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (pela melhora da função do endotélio e redução de marcadores inflamatórios), alguns tipos de câncer (PAZ et al., 2015; BABBAR et al., 2011; SOTO et al., 2011), doenças neurológicas, (SOTO et al., 2011; PATRAS et al., 2010), envelhecimento cutâneo (SOTO et al., 2011; PESCHEL et al., 2006), entre outras.

Os compostos bioativos presentes nos alimentos são susceptíveis à rápida degradação ou inativação. Sendo assim, alguns processos aos quais os alimentos são submetidos podem levar a alterações desse composto, podendo repercutir na perda do valor nutricional, entre esses processos está o tratamento térmico. As antocianinas, por exemplo, são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, azul e púrpura de diversas frutas e verduras, e apresentam grande sensibilidade à luz, ao oxigênio, a variações de temperatura e de pH, ressaltando a importância de técnicas de preparações na preservação de nutrientes de um alimento (MERCALI et al., 2013; PATRAS et al., 2010), assim como o método de processamento.

Figura 4: Estruturas dos ácidos benzóico e hidroxicinâmicos, flavonóides e estilbenos



Fonte: LEOPOLDINI, RUSSO e TOSCANO, 2011

3.5 Acerola

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), também conhecida como cereja de barbados é uma fruta com um notório valor nutricional, de fácil adaptação a diferentes solos e climas, crescendo na Europa Central e América do Sul (MEZADRI et al., 2008), e apresenta compostos bioativos que são benéficos para a saúde humana (SOUZA et al., 2011). Conhecida pelo seu elevado teor de vitamina C, além de ser composta por antocianinas, carotenóides (MERCALI et al., 2013; SOUZA et al., 2011; MEZADRI et al., 2008), ferro, cálcio (MERCALI et al., 2013; MEZADRI et al., 2008) e que vem mostrando um alto potencial antioxidativo (MEZADRI et al., 2008).

A composição das frutas pode variar perante algumas situações, como: clima, condições de plantio, estágio de maturação, localização geográfica (MEZADRI et al., 2008), tipos de processamento aos quais os frutos são submetidos, entre outras (MERCALI et al., 2013; MEZADRI et al., 2008). Como por exemplo, o teor de vitamina C que decresce com a maturidade do fruto, embora ainda apresente uma boa quantidade (LIMA et al., 2011).

Lima et al. (2011) avaliaram a capacidade de sequestro de radicais livres das antocianinas purificadas na acerola de diferentes genótipos e observaram que todas mostraram um forte potencial de atuação como antioxidante. Souza et al. (2011), investigaram os efeitos da adição de polpa de manga e de acerola em biofilmes à base de mandioca, na aplicação em óleo de palma e identificaram resultados positivos no índice de peróxido do óleo, porém observaram que o alto conteúdo de vitamina C da polpa de acerola poderia atuar como pró-oxidante, deixando como sugestão a utilização de concentrações menores desse composto.

Caetano e colaboradores (2011) levando em consideração o valor dos resíduos das frutas de acerola, estudaram o efeito antioxidante que esses subprodutos poderiam apresentar e a partir da retirada do extrato com diferentes solventes (acetona, metanol e etanol), referenciaram um alto poder antioxidante em todos eles, embora o extrato metanólico e etanólico tenham apresentado melhores resultados. Assim, ficando claro que os resíduos agroindustriais podem ser considerados boas fontes de antioxidantes naturais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL WAHAB, M.; ABDOU, E. S. Influence of starch and glycerol on the properties of chitosan by positron annihilation spectroscopy. **Journal of applied polymer science**, v. 116, n. 5, p. 2874-2883, 2010.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 837-842, 2010.

ANRAKU, M., FUJII, T., KONDO, Y., KOJIMA, E., HATA, T., TABUCHI, N., TOMIDA, H. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 501-505, 2011.

ANRAKU, M., TANAKA, M., HIRAGA, A., NAGUMO, K., IMAFUKU, T., MAEZAKI, Y., OTAGIRI, M. Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients. **Carbohydrate polymers**, v. 112, p. 152-157, 2014.

ARANAZ, I., MENGÍBAR, M., HARRIS, R., PAÑOS, I., MIRALLES, B., ACOSTA, N., HERAS, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, 2009.

ATOUI, A. K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

AYALA-ZAVALA, J. F., ROSAS-DOMÍNGUEZ, C., VEGA-VEGA, V., GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. R175-R181, 2010.

BABBAR, N., OBEROI, H. S., UPPAL, D. S., PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.

BHATNAGAR, A., SILLANPÄÄ, M. Applications of chitin-and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater—a short review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 152, n. 1, p. 26-38, 2009.

BITENCOURT, C. M., FÁVARO-TRINDADE, C. S., SOBRAL, P. J. A., CARVALHO, R. A. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 145-152, 2014.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm>. Acesso em: 23 de maio de 2015.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

- CAETANO, A.C.S.; ARAÚJO, C.R.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.I.S.; MELO, E.A. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. *Journal of Food Science and Technology – Campinas*, v31, n.3, p.769-775, 2011.
- CAO, Y., GU, W., ZHANG, J., CHU, Y., YE, X., HU, Y., CHEN, J. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. *Food chemistry*, v. 141, n. 3, p. 1655-1660, 2013.
- CASETTARI, L., GENNARI, L., ANGELINO, D., NINFALI, P., CASTAGNINO, E. ORAC of chitosan and its derivatives. *Food hydrocolloids*, v. 28, n. 2, p. 243-247, 2012.
- CHENG, SIANG-YING; WANG, BE-JEN; WENG, YIH-MING. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT-Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 115-121, 2015.
- CHIEN, P. J., SHEU, F., HUANG, W. T., SU, M. S. Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. *Food Chemistry*, v. 102, n. 4, p. 1192-1198, 2007.
- CRUZ-ROMERO, M. C., MURPHY, T., MORRIS, M., CUMMINS, E., KERRY, J. P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control*, v. 34, n. 2, p. 393-397, 2013.
- DA SILVA, L. M. R., DE FIGUEIREDO, E. A. T., RICARDO, N. M. P. S., VIEIRA, I. G. P., DE FIGUEIREDO, R. W., BRASIL, I. M., GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*, v. 143, p. 398-404, 2014.
- DAI, JIN; MUMPER, RUSSELL J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
- DAINELLI, D., GONTARD, N., SPYROPOULOS, D., ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN, E., TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, v. 19, p. S103-S112, 2008.
- DANG, KHANH MINH; YOKSAN, RANGRONG. Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan. *Carbohydrate polymers*, v. 115, p. 575-581, 2015.
- DE ALVARENGA, E. S.; DE OLIVEIRA, C. P.; BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 4, p. 1155-1160, 2010.
- DI PIERRO, P., SORRENTINO, A., MARINIELLO, L., GIOSAFATTO, C. V. L., Porta, R. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.

DIMZON, I. K. D.; KNEPPER, T. P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 939-945, 2015.

DUTTA, P. K., TRIPATHI, S., MEHROTRA, G. K., DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

ELSABEE, MAHER Z.; ABDU, ENTAR S. Chitosan based edible films and coatings: a review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FERREIRA, A. S., NUNES, C., CASTRO, A., FERREIRA, P., COIMBRA, M. A. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 490-499, 2014.

GÓMEZ-ESTACA, J., LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., CATALÁ, R., & GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 42-51, 2014.

HUGO, C. J.; & HUGO, A. Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 12-23, 2015.

IGLESIAS, J., PAZOS, M., TORRES, J. L., MEDINA, I. Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and α -tocopherol. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1767-1774, 2012.

ISLAM, S.; SHAHID, M; MOHAMMAD, F. Perspectives for natural product based agents derived from industrial plants in textile applications—a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 2-18, 2013.

JOUKI, M., YAZDI, F. T., MORTAZAVI, S. A., KOOCHKI, A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, 2014.

KASAAI, M. R. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1667-1676, 2009.

KHARE, A. K.; BISWAS, A. K.; SAHOO, J. Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 286-293, 2014.

KHOSHGOZARAN-ABRAS, S., AZIZI, M. H., HAMIDY, Z., BAGHERIPOOR-FALLAH, N. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2058-2062, 2012.

KIM, S. J., CHO, A. R., HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 112-120, 2013.

KONG, M., CHEN, X. G., XING, K., PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

KRAJEWSKA, B; WYDRO, P; JAŃCZYK, A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4144-4152, 2011.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHARI, D. L.; RAJALAKSHMI, D.; NARASINHAN S. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker. 1996. 450p

JAYASINGHE, C.; GOTOH, N.; WADA, S. Pro-oxidant/antioxidant behaviours of ascorbic acid, tocopherol, and plant extracts in n-3 highly unsaturated fatty acid rich oil-in-water emulsions. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3077-3084, 2013.

LAVORGNA, M., PISCITELLI, F., MANGIACAPRA, P., BUONOCORE, G. G. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 291-298, 2010.

LECETA, I., GUERRERO, P., DE LA CABA, K. Functional properties of chitosan-based films. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 1, p. 339-346, 2013.

LECETA, I., PEÑALBA, M., ARANA, P., GUERRERO, P., DE LA CABA, K. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **European Polymer Journal**, v. 66, p. 170-179, 2015.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.

LI, J. H., MIAO, J., WU, J. L., CHEN, S. F., & ZHANG, Q. Q. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166-173, 2014.

LIMA, V. L. A. G. D., MELO, E. A., PINHEIRO, I. O., GUERRA, N. B. Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 1, p. 86-92, 2011.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., GÓMEZ-ESTACA, J., CATALÁ, R., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1376-1384, 2012.

LUPO, B., MAESTRO, A., PORRAS, M., GUTIÉRREZ, J. M., GONZÁLEZ, C. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 56-65, 2014.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305-315, 2010.

MASTROMATTEO, M., MASTROMATTEO, M., CONTE, A., DEL NOBILE, M. A. Advances in controlled release devices for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 12, p. 591-598, 2010.

MERCALI, G. D., JAESCHKE, D. P., TESSARO, I. C., MARCZAK, L. D. F. Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 853-857, 2013.

MEZADRI, T., VILLAÑO, D., FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S., GARCÍA-PARRILLA, M. C., TRONCOSO, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 21, n. 4, p. 282-290, 2008.

MIN, B., CORDRAY, J. C., AHN, D. U. Antioxidant effect of fractions from chicken breast and beef loin homogenates in phospholipid liposome systems. **Food chemistry**, v. 128, n. 2, p. 299-307, 2011.

MOO-HUCHIN, V. M., ESTRADA-MOTA, I., ESTRADA-LEÓN, R., CUEVAS-GLORY, L., ORTIZ-VÁZQUEZ, E., Y VARGAS, M. D. L. V., SAURI-DUCH, E. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food chemistry**, v. 152, p. 508-515, 2014.

MOO-HUCHIN, V. M., MOO-HUCHIN, M. I., ESTRADA-LEÓN, R. J., CUEVAS-GLORY, L., ESTRADA-MOTA, I. A., ORTIZ-VÁZQUEZ, E., SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, 2015.

NO, H. K., KIM, S. H., LEE, S. H., PARK, N. Y., Prinyawiwatkul, W. Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 2, p. 174-178, 2006.

NORAJIT, KRITTIKA; KIM, KI MYONG; RYU, GI HYUNG. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377-384, 2010.

NORONHA, C. M., DE CARVALHO, S. M., LINO, R. C., BARRETO, P. L. M. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food chemistry**, v. 159, p. 529-535, 2014.

NUNES, C., MARICATO, É., CUNHA, Â., NUNES, A., DA SILVA, J. A. L., COIMBRA, M. A. Chitosan–caffeic acid–genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 1, p. 236-243, 2013.

OJAGH, S. M., REZAEI, M., RAZAVI, S. H., HOSSEINI, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 161-166, 2010.

PARK, P. J., JE, J. Y., KIM, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 17-22, 2004.

PATRAS, A., BRUNTON, N. P., O'DONNELL, C., TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.

PAZ, M., GÚLLON, P., BARROSO, M. F., CARVALHO, A. P., DOMINGUES, V. F., GOMES, A. M., DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

PELTZER, P. M., LAJMANOVICH, R. C., SÁNCHEZ-HERNANDEZ, J. C., CABAGNA, M. C., ATTADAMO, A. M., BASSÓ, A. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 1, p. 185-197, 2008.

PENG, YONG; LI, YUNFEI. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 287-293, 2014.

PERDONES, Á., VARGAS, M., ATARÉS, L., CHIRALT, A. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 256-264, 2014.

PERUMALLA, A. V. S., HETTIARACHCHY, N. S. NAVAM S. Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

PESCHEL, W., SÁNCHEZ-RABANEDA, F., DIEKMANN, W., PLESCHER, A., GARTZÍA, I., JIMÉNEZ, D., CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in polymer science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

REGULAMENTO (CE) N. o 450/2009 DA COMISSÃO de 29 de Maio de 2009 relativo aos materiais e objectos activos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos, acessado <<http://www.consulai.com>>, em 26 de maio de 2015.

SAMPAIO, G. R., SALDANHA, T., SOARES, R. A. M., TORRES, E. A. F. S. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1383–1390, 2012

SANTACRUZ, S., RIVADENEIRA, C., CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 89-94, 2015.

SHAH, M. A., BOSCO, S. J. D., MIR, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 21-33, 2014.

- SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102-108, 2012.
- SOTO, M. L., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 105, N. 1, P. 1-27, 2011.
- SOUZA, C. O., SILVA, L. T., SILVA, J. R., LÓPEZ, J. A., VEIGA-SANTOS, P., DRUZIAN, J. I. Mango and Acerola pulps as antioxidant additives in Cassava starch bio-based film. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2248-2254, 2011.
- STAROSZCZYK, H., SZTUKA, K., WOLSKA, J., WOJTASZ-PAJAŁ, A., KOŁODZIEJSKA, I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 707-712, 2014.
- SUGANO, M., WATANABE, S., KISHI, A., IZUME, M., OHTAKARA, A. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. **Lipids**, v. 23, n. 3, p. 187-191, 1988.
- SUNG, S. Y., SIN, L. T., TEE, T. T., BEE, S. T., RAHMAT, A. R., RAHMAN, W. A. W. A., VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 110-123, 2013.
- SUN-WATERHOUSE, D., ZHOU, J., MISKELLY, G. M., WIBISONO, R., & WADHWA, S. S. Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1049-1056, 2011.
- THADATHIL, N., VELAPPAN, S. P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. **Food chemistry**, v. 150, p. 392-399, 2014.
- VAN DEN BROEK, L. A., KNOOP, R. J., KAPPEN, F. H., BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015.
- WANG, L., DONG, Y., MEN, H., TONG, J., ZHOU, J. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2013.
- WANG, H., ZHANG, R., ZHANG, H., JIANG, S., LIU, H., SUN, M., JIANG, S. Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly (vinyl alcohol). **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 64-71, 2015.
- WATERHOUSE, G. I., WANG, W., SUN-WATERHOUSE, D. Stability of canola oil encapsulated by co-extrusion technology: Effect of quercetin addition to alginate shell or oil core. **Food chemistry**, v. 142, p. 27-38, 2014.
- WU, J., CHEN, S., GE, S., MIAO, J., LI, J., ZHANG, Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 42-51, 2013.

ARTIGO 1

Avaliação da influência da concentração da quitosana e do antioxidante nas propriedades dos filmes bioativos: Planejamento Experimental DCCR

Sydia Darcila Oliveira Machado, Cristana Maria Pedroso Yoshida, Enayde de Almeida
Melo, Andreлина Maria Pinheiro Santos

RESUMO

A mudança do perfil do consumidor, quanto à segurança alimentar e a preocupação com o meio ambiente vêm sendo determinante para o desenvolvimento de novos materiais de embalagens e as embalagens ativas buscam atender essas novas tendências mercadológicas. Assim, esse trabalho objetivou definir as concentrações de quitosana e do extrato hidroetanólico do resíduo da acerola (EHRA) para obtenção de filmes com flexibilidade e rigidez diferenciadas, com retenção de compostos fenólicos e com potencial antioxidante, aplicando-se a técnica do planejamento experimental DCCR (Delineamento Central de Composto Rotacional). Dezesete ensaios foram conduzidos, dentre os quais os Ensaio 3 (RCF= $4,4 \pm 0,08$ mg/ge PA= $25,2 \pm 0,11\%$); Ensaio 4 (RCF= $1,5 \pm 0,21$ mg/g e PA= $15,8 \pm 0,21\%$) e Ensaio 12 (RCF= $4,1 \pm 0,66$ mg/g e PA= $22,4 \pm 1,73\%$) apresentaram os melhores resultados em relação a retenção de fenólicos e o potencial antioxidante, parâmetros considerados mais significativos para caracterização dos filmes obtidos neste trabalho. Desta forma, a técnica do planejamento experimental empregada neste estudo possibilitou a obtenção de filmes com propriedade antioxidante, possibilitando novas formulações de embalagens com potenciais ativos, para poder fornecer maior proteção e garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, de modo a atender as expectativas de um consumidor cada vez mais exigente.

Palavras-chaves: Resíduo de acerola, atividade antioxidante, filme de quitosana

ABSTRACT

The change in consumer profile, as food safety and concern for the environment have been key to the development of new packaging materials and active packaging seek to meet these new market trends. Within this context, this study aimed to determine the concentrations of chitosan and hydroethanolic extract the residue of acerola (EHRA) to obtain films with flexibility and differentiated rigidity, with retention of phenolic compounds and antioxidant potential, applying the technique the CCRD experimental design (Compound Center Delineation Rotational). Seventeen trials were conducted, among which the Trial 3 (RCF = 4.4 ± 0.08 mg / g PA = $25.2 \pm 0.11\%$); Test 4 (RCF = $1.5 \pm 0,21$ mg / g PA = $15.8 \pm 0.21\%$) and test 12 (RCF = $4.1 \pm 0,66$ mg / g PA = $22.4 \pm 1.73\%$) showed the best results regarding the retention of phenolic compounds and the antioxidant potential parameters considered most important for characterization of the films obtained in this work. Thus, the technique employed experimental design in this study made it possible to obtain films with antioxidant properties, enabling new packaging formulations with potential assets, in order to provide greater protection and ensure the quality and safety of food in order to meet the expectations of an increasingly demanding consumer.

Keywords: Acerola residue, antioxidant activity, chitosan film

1. INTRODUÇÃO

O interesse de novos materiais biodegradáveis e embalagens ativas a ser usado pela indústria de alimentos vêm crescendo nos últimos anos com objetivo de obter materiais com propriedades mecânicas e de barreira compatíveis com a aplicação. A importância e interesse por esta linha de pesquisa decorrem das mudanças do perfil do consumidor nos últimos tempos, que buscam aumento da vida útil dos produtos, segurança, qualidade dos alimentos e, redução no impacto ambiental provocado pelas embalagens tradicionais.

As embalagens ativas e biodegradáveis vêm ganhando destaque por atender estes requisitos, e neste segmento pode-se citar como material biodegradável a quitosana, um biopolímero obtido de fonte renovável, podendo ser extraído do resíduo da indústria de pescado (FERNANDEZ-SAIZ; OCIO; LAGARON, 2010; KURITA, 2006) como também por via microbiana, como das paredes celulares dos fungos, das cutículas de insetos (NGAH; TEONGA; HANAFIAH, 2011; FERNANDEZ-SAIZ, OCIO, LAGARON, 2010), leveduras, protozoários e microalgas verdes (VAN DEN BROEK et al., 2015).

Embalagens poliméricas ou biopoliméricas ativas podem ser definidas como a incorporação de componentes a matriz polimérica que interagem com a superfície do alimento pela migração do composto ativo aprisionado na matriz biopolimérica (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014). Esta liberação pode ser controlada e ocorrer de forma lenta, garantindo maior segurança e qualidade sem modificar o alimento (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012; DAINELLI et al., 2008).

Dentro deste contexto, diversos estudos vêm sendo realizados com diferentes agentes e biopolímeros, como o alginato com extrato de ginseng (NORAJIT, KIM, RYU, 2010), ou com óleo de orégano (BENAVIDES, VILLALOBOS-CARVAJAL, REYES, 2012), a proteína de soja com óleos essenciais de orégano e tomilho (EMIROĞLU et al., 2010), a quitosana com extrato de semente de uva e carvacrol (RUBILAR et al., 2013), a carragena incorporada com óleo essencial de seriguela (*Satureja hortensis*) (SHOJAEI-ALIABADI et al., 2013), a gelatina incorporado com extrato de chá verde (WU et al., 2013), com extrato etanólico de propólis (BODINI et al., 2013) ou com antioxidantes naturais oriundos de extrato de chá verde, extrato de semente de uva, extrato de gengibre, extrato da folha do ginkgo (LI et al., 2014), uma mistura de amaranto, amido e quitosana incorporados com óleo essencial de canela, erva cidreira e orégano (AVILA-SOSA et al., 2012), o amido de arroz

com óleo de coco e extrato de chá (*Camellia Sinensis*) (DAS, DUTTA e MAHANTA, 2013) e oPHB (poli 3-hidroxibutirato) e PLA (poli-ácido láctico) como matrizes de suporte para o carvacrol (ARMENTANO et al., 2015), entre outros.

O emprego das embalagens biopoliméricas ativas tem como uma das vantagens a redução de conservantes durante o processamento do produto, tornando-o mais atrativo para os consumidores. Sendo assim, a embalagem, a depender das características do agente ativo a ser incorporado, poderá adquirir propriedades diferenciadas, como ação antioxidante, com a utilização de chá verde em filmes de quitosana (SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010) e em filmes de gelatina (WU et al., 2013); antimicrobiana, com a adição de nisina em filmes de quitosana e poli (álcool vinílico) (WANG et al., 2015) e com óleo essencial de alecrim e nanoargila em igual matriz (ABDOLLAHI, REZAEI, FARZI et al., 2012); pigmentação diferenciada, com extrato de cúrcuma em bases de gelatina (BITENCOURT et al., 2014) e antocianinas na matriz de quitosana (YOSHIDA et al., 2014) e aromas, com incorporação de compostos aromáticos na matriz de alginato (HAMBLETON et al., 2009), tornando a aplicação industrial de filmes biopoliméricos bastante diversificada.

Estes materiais podem, portanto, ser utilizados na indústria de carnes, na fruticultura e em alimentos processados visando redução da ação oxidativa, antimicrobiana ou incorporando aromas, sabor, ou ainda aumentar o valor nutricional do produto, como por exemplos as embalagens comestíveis (BERENDSEN et al., 2014; MA et al., 2013; YOSHIDA e ANTUNES, 2009; ZINOVIADOU, KOUTSOUMANIS e BILIADERIS, 2009).

No caso do antioxidante, os sintéticos vêm sendo utilizados pelas indústrias de alimentos desde os anos 40, entretanto, assim como em outros Países, no Brasil o seu uso é controlado. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2011), por meio da RDC N° 64, de 16 de setembro de 2008 estabelece como concentração máxima permitida 0,02g. 100g⁻¹ para butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terc butil hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Então, frente aos efeitos adversos à saúde atribuídos aos antioxidantes sintéticos em concentrações acima do limite máximo permitido (LMP) pela legislação, ênfase tem sido dada à busca por antioxidantes provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos e muitos estão centralizados nos

compostos fenólicos de resíduos agroindustriais, fontes promissoras de antioxidante naturais, a exemplo do resíduo de acerola (CAETANO et al., 2011; CAETANO et al., 2009); de umbu cajá (SILVA et al., 2012); e de manga Tommy Atkins (ARAÚJO et al., 2014), entre outros.

Na elaboração de embalagens biopoliméricas ativas, considerando a especificidade do biopolímero e dos compostos fenólicos extraídos de resíduos agroindustriais, torna-se importante a aplicação do planejamento fatorial. Esta ferramenta vem sendo muito usada para definir as condições de processo tendo em vista que permite observar, ao mesmo tempo, a influência de variáveis sobre uma resposta desejada, reduzindo o tempo e o número de experimentos, com uma boa confiabilidade nos resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Neste trabalho, objetivando a obtenção de filmes de quitosana incorporado com o extrato do resíduo agroindustrial de acerola, aplicou-se a técnica do planejamento experimental DCCR para definir a concentração de quitosana e do antioxidante natural, em relação ao potencial antioxidante. Os filmes obtidos foram avaliados quanto à capacidade de retenção do composto fenólico e do potencial antioxidantes, na perspectiva de aplicá-los no desenvolvimento de um novo material de embalagens para indústria de alimentos proporcionando a inibição da oxidação, e com ação microbiana, de barreira a gases, de barreira à luminosidade, entre outros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

As matérias-primas utilizadas para a preparação dos filmes foram: quitosana de peso molecular médio (SIGMA-ALDRICH chemistry), glicerol (NUCLEAR), e o extrato obtido de resíduos agroindustriais de acerola. O solvente utilizado foi a solução de ácido acético glacial (DINÂMICA). Todas as matérias- primas são de grau alimentício. O projeto foi desenvolvido no laboratório do Departamento de Ciências Domésticas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.2 Obtenção dos extratos

Os compostos fenólicos foram extraídos a partir da farinha, produzidas a partir de resíduos de sementes, resquícios de polpa e casca da acerola. Foram pesadas 20g da farinha, para terem seus compostos extraídos em 200 mL de solução etanólica (60%), durante 30

minutos em agitação (400rpm). Os extratos foram centrifugados e o volume final foi rotoevaporizado para 50 ml, sendo em seguida armazenados a temperatura de -22⁰C para análises e aplicações posteriores.

2.3 Planejamento Experimental e Análise da Superfície de Resposta

Aplicação do Planejamento Experimental no processo para obtenção de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado com objetivo de definir as concentrações de quitosana e do extrato hidroetanólico de acerola de modo a propiciar a formação de filmes com flexibilidade e rigidez diferenciadas, boa retenção dos compostos fenólicos, com potencial antioxidante, além de transparência e cor. O uso desta técnica do planejamento experimental combinada com a análise da superfície de resposta permite avaliar o comportamento das variáveis de forma global, obtendo resultados estatisticamente significativos com modelos representativos do processo para a faixa estudada neste trabalho (Tabela 01).

Os filmes obtidos segundo os planejamentos experimentais acima mencionados foram submetidos às seguintes determinações: teor de fenólicos totais (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999) e capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Os resultados foram expressos, respectivamente, em mg em equivalente de ácido gálico por mL do extrato (mg EAG. mL⁻¹) e em % de sequestro do radical DPPH. Os filmes também foram submetidos a análise instrumental da cor no sistema CIE Lab.

Tabela 1- Matriz do delineamento fatorial 2^3 - composto central rotacional (DCCR), níveis codificados e decodificados das variáveis, para obtenção filmes de quitosana e antioxidante obtido do extrato hidroetanólico de resíduo acerola (EHRA).

Ensaio	Quitosana (%)	Fenólicos (mg/g)	Plastificante (ml)
01	-1 (0,68)	-1 (8,7)	-1 (0,2)
02	1 (1,32)	-1 (8,7)	-1 (0,2)
03	-1 (0,68)	1 (34,8)	-1 (0,2)
04	1 (1,32)	1 (34,8)	-1 (0,2)
05	-1 (0,68)	-1 (8,7)	1 (0,4)
06	1 (1,32)	-1 (8,7)	1 (0,4)
07	-1 (0,68)	1 (34,8)	1 (0,4)
08	1 (1,32)	1 (34,8)	1 (0,4)
09	-1,68 (0,5)	0 (21,7)	0 (0,3)
10	1,68 (2,0)	0 (21,7)	0 (0,3)
11	0 (1,0)	-1,68 (0,0)	0 (0,3)
12	0 (1,0)	1,68 (43,5)	0 (0,3)
13	0 (1,0)	0 (21,7)	-1,68 (0,13)
14	0 (1,0)	0 (21,7)	+ 1,68 (0,53)
15	0 (1,0)	0 (21,7)	0 (0,3)
16	0 (1,0)	0 (21,7)	0 (0,3)
17	0 (1,0)	0 (21,7)	0 (0,3)

2.4 Preparação dos filmes quitosana/extrato

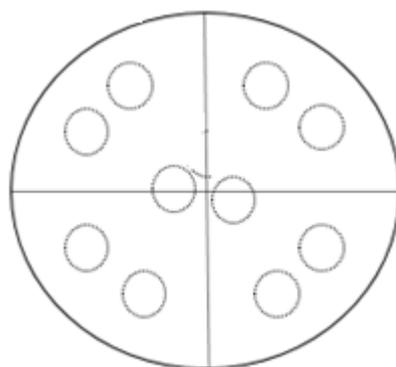
Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*, onde a solução de quitosana foi preparada solubilizando em solução aquosa de ácido acético glacial (0,5%, v/v). Adicionou-se o extrato de acerola e glicerol (plastificante), em seguida, agitou-se magneticamente por 60 minutos, a uma velocidade de 1000rpm e à temperatura ambiente ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$). O plastificante e o extrato de acerola foram adicionados nos últimos 15 e 10 minutos, respectivamente. Setenta gramas da solução foram aplicados em placas de Petri (150x15mm) e então foram submetidos à secagem $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa com circulação de ar (MA035- MARCONI) por 48 horas. Os filmes foram armazenados em dessecador, contendo sílica gel, para posterior análise.

2.5 Extração dos compostos presentes nos filmes

A extração dos compostos fenólicos presentes nos filmes foi feita segundo a metodologia de Wang et al. (2013) com adaptações. Retirou-se amostras em 10 pontos (1,2cm) de cada filme, conforme esquema apresentado na Fig 1. As amostras foram pesadas e imersas em 10 mL de etanol, em seguida agitou-se (100 rpm) durante 30 minutos. Este

extrato foi utilizado para quantificação de fenólicos totais e percentual de sequestro de DPPH.

Figura 01- Esquema demonstrativo da seleção das amostras para análise de fenólicos.



Os extratos obtidos foram submetidos à quantificação dos fenólicos totais de acordo com a metodologia proposta por Wettasinghe e Shahidi (1999) e curva padrão de ácido gálico (10 a 120 μ g/mL, com $R^2=0,9997$). Os resultados foram expressos em mg de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico (EAG) por mL do extrato. A leitura foi realizada sob absorvância de 725 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC). (Eq.1)

Para a determinação dos fenólicos presentes nos filmes, seguiu-se a Eq 1:

$$T = \frac{C \times V}{M}$$

Onde T é o conteúdo total de fenólicos, em miligramas por grama de filme seco; C é a concentração de ácido gálico estabelecida a partir da curva de calibração em miligrama por mililitro; V é o volume de filme do extrato, em mililitro e M é o peso do filme seco, em grama, conforme descrito por Moradi et al. (2012).

2.6 Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos filmes de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH) foi avaliada segundo método descrito por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. A absorvância de uma alíquota de 0,5ml da solução dos compostos extraídos dos filmes, adicionados de 2,5 ml da solução de radical DPPH (6×10^{-5} mol/L, ajustada para uma absorvância entre 0,7 a 0,8), foi a 517 nm registrada, em

espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC). A absorvância monitorada até a amostra atingir o platô (30 minutos) e a capacidade antioxidante foi calculada utilizando a Eq. 2:

$$\% \text{ de sequestro} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Onde a absorvância do controle é referente à solução de DPPH sem a presença do extrato e a absorvância da amostra é referente à absorvância da reação da solução de DPPH com o extrato.

2.7 Parâmetros de cor dos filmes

A análise instrumental da cor foi realizada por meio da colorimetria de triestímulos, no sistema CIE Lab, utilizando um colorímetro CHROMA METER CR-400 (Konica Minolta®, Japão) no modo de refletância, e o iluminante C. A cor, expressa no sistema CIE Lab ($L^*a^*b^*$), é especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares: o eixo “L” (luminosidade) que varia do preto (0%) ao branco (100%); o eixo “a”, do verde (-a) ao vermelho (+a) e o eixo “b”, do azul (-b) ao amarelo (+b). Para a determinação dos parâmetros da cor, os filmes foram sobrepostos em uma placa branca, as leituras de L^* ; a^* e b^* foram efetuadas em 5 (cinco) diferentes pontos dos filmes, e os dados submetidos ao cálculo da média aritmética.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

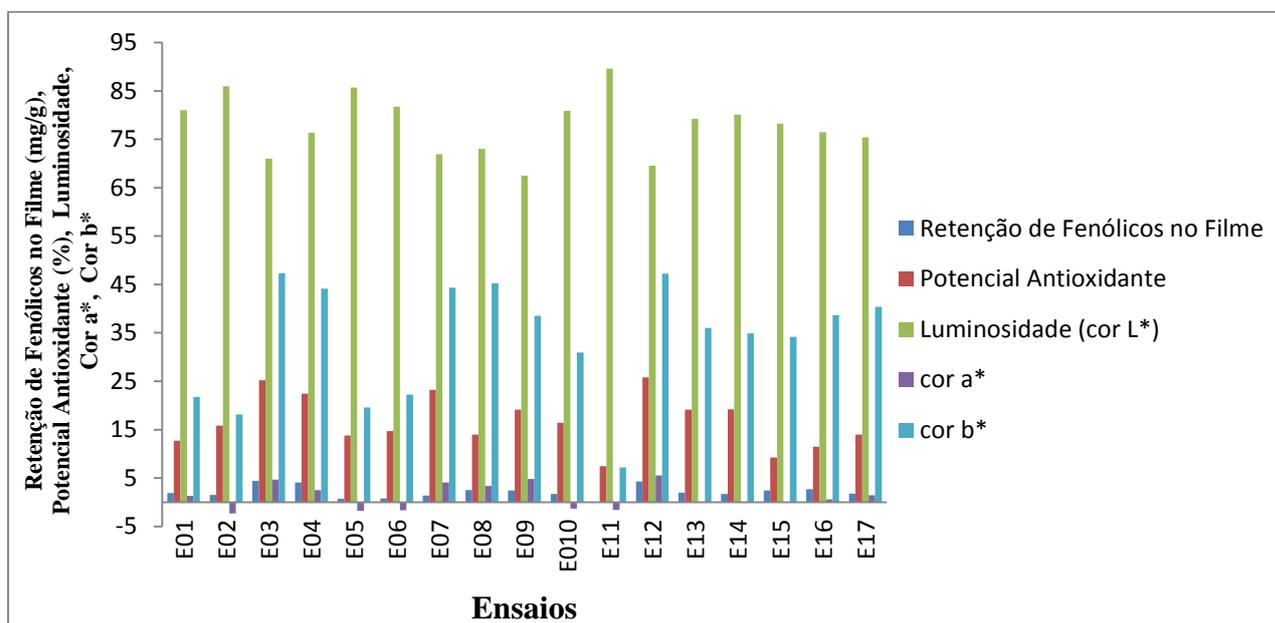
A análise dos resultados foi focada para os filmes com boa retenção de compostos fenólicos, capacidade de sequestro do radical DPPH e concentração de quitosana adequada para a formação do filme com boa flexibilidade. A análise dos dados permite evidenciar que todas as condições testadas propiciaram a formação de filmes, possíveis de serem retirados do suporte plano. Entretanto, os filmes formulados com baixa concentração de quitosana (0,5%, m/m), se caracterizaram por maior fragilidade ao manuseio. Os melhores resultados relativos à retenção de fenólicos (RF) e a capacidade antioxidante (DPPH) foram obtidos

nos ensaios 03 (RF=4,4±0,08mg/g; DPPH=25,2±0,11%), 04 (RF=4,1±0,66 mg/g; DPPH=22,4±1,73%), 12 (RF=4,3±0,60 mg/g; DPPH=25,8±0,52%) (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 2-Retenção de fenólicos no filme, potencial de sequestro de DPPH, parâmetros de cor (Luminosidade, cor a* e cor b*) os filmes de quitosana aditivada com antioxidantes (extrato hidroetanólico do resíduo de acerola - EHRA).

Ensaio	VARIÁVEIS INDEPENDENTES				RESPOSTA			
	Quitosana (%)	Fenólicos (mg/g)	Plastificante (ml)	Retenção fenólicos (RF) (mg/g)	Sequestro do radical DPPH (%)	Cor		
						L*	a*	b*
01	0,68	8,7	0,2	1,9±0,14	12,7±1,55	80,99 ±1,11	-1,34 ±0,11	21,77 ±2,83
02	1,32	8,7	0,2	1,5±0,21	15,8±1,70	85,93±1,45	-2,35 ±0,15	18,15 ±2,10
03	0,68	34,8	0,2	4,4±0,08	25,2±0,11	70,96 ±1,03	4,65 ±1,19	47,33 ±2,35
04	1,32	34,8	0,2	4,1±0,66	22,4±1,73	76,35 ±2,61	2,5 ±1,80	44,1 ±3,60
05	0,68	8,7	0,4	0,7±0,05	13,8±0,30	85,72 ±0,59	-1,77 ±0,22	19,57 ±1,44
06	1,32	8,7	0,4	0,8±0,12	14,7±0,65	81,73 ±2,07	-1,65 ±0,18	22,2 ±4,74
07	0,68	34,8	0,4	1,4±0,31	23,2±1,78	71,88 ±3,78	4,07 ±2,58	44,3 ±5,61
08	1,32	34,8	0,4	2,5±0,26	14±0,58	73,05 ±1,93	3,35 ±1,44	45,25 ±2,36
09	0,5	21,7	0,3	2,4±0,26	19,1±1,35	67,5 ±4,37	4,78 ±1,82	38,53 ±3,34
10	2,0	21,7	0,3	1,7±0,05	16,4±0,30	80,91 ±1,75	-1,35 ±0,44	30,96 ±2,54
11	1,0	0,0	0,3	0,0±0,0	7,43±0,03	89,56 ±0,32	-1,59 ±0,19	7,21 ±1,33
12	1,0	43,5	0,3	4,3±0,60	25,8±0,52	69,54 ±2,48	5,52 ±1,95	47,24 ±3,38
13	1,0	21,7	0,13	2,0±0,21	19,1±2,79	79,24 ±1,42	0,08 ±0,82	35,99 ±4,11
14	1,0	21,7	0,53	1,7±1,12	19,2±0,13	80,1 ±2,54	-0,16 ±1,62	34,9 ±8,35
15	1,0	21,7	0,3	2,4±0,62	9,2±2,05	78,22 ±2,85	-0,08 ±1,19	34,19 ±6,10
16	1,0	21,7	0,3	2,7±0,18	11,5±0,27	76,46 ±0,98	0,58 ±0,46	38,65 ±1,46
17	1,0	21,7	0,3	1,8±0,25	14,0±0,10	75,39 ±1,49	1,45 ±1,39	40,39 ±4,67

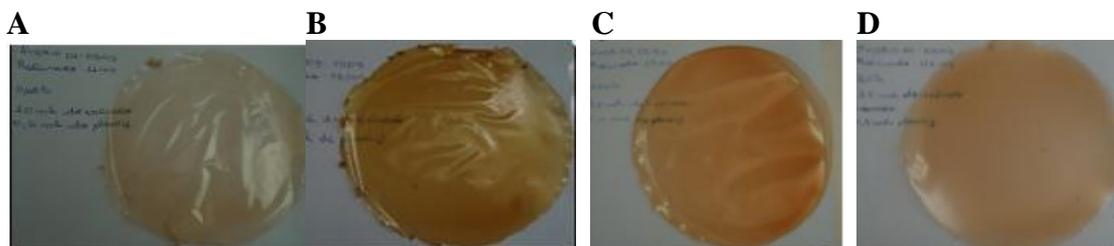
Figura 2-Retenção dos fenólicos no filme, potencial antioxidante e parâmetros de cor dos dezessete ensaios



Embora o parâmetro cor não tenha sido considerado crítico para definir as melhores condições experimentais para obtenção dos filmes, uma vez que em função da pigmentação natural do extrato adicionado, a intensidade da cor variou de acordo com quantidade do extrato adicionada e retida no filme, seus resultados foram explicitados. Em relação aos valores dos parâmetros de cor a* e b* (cor vermelha e amarela, respectivamente), evidencia-se que os filmes se apresentaram levemente vermelho com tendência para o amarelo. O resíduo de acerola após a secagem em estufa apresentou uma cor marrom, e a coloração do extrato obtido foi marrom-amarelada ($L^* = 41,9 \pm 0,02$, $a^* = 11,03 \pm 0,05$, $b^* = 35,7 \pm 0,05$). Sendo assim, os filmes com maiores valores de a* e b* foram aqueles que apresentam maior retenção de fenólicos, conseqüentemente maior retenção do extrato no filme (ensaios 3, 4 e 12).

Na Figura 03 pode-se observar a influência da concentração do extrato adicionado e retido no gel de quitosana na cor dos filmes obtidos, justificando desta forma que os parâmetros de cor não podem ser considerados uma variável crítica para determinar as melhores condições para elaboração destes filmes. As diferentes intensidades de cores observadas nesses filmes torna-se importante para a sua aplicação em embalagens para alimentos que precisam ser protegidos da luz. Assim, esta embalagem elaborada com este tipo de filme apresentaria tanto propriedade antioxidante como de barreira a luminosidade.

Figura 3- Filmes de quitosana com extrato antioxidante com diferentes graus de retenção, correspondendo aos ensaios: (A) Ensaio 01(RF=1,9±0,14 mg/g), (B) Ensaio 03 (RF=4,4±0,08 mg/g), (C) Ensaio 04 (RF = 4,1±0,66 mg/g) e (D) Ensaio 12 (RF = 4,3±0,60 mg/g).



A aplicação de um material como embalagem envolve a sua coloração, pois dependendo do produto alimentício, o consumidor tem preferência por materiais transparentes. No entanto, nos alimentos em que a embalagem visa reduzir a incidência de reações de oxidação lipídica, a coloração do filme poderá favorecer por agir como barreira a luminosidade tendo em vista que a luz é um fator acelerador do processo de rancificação (PERUMALLA e HETTIARACHCHY, 2011). Porém, a escolha do filme não se restringe apenas a sua coloração, mas também a combinação da cor com os outros parâmetros, principalmente com a sua capacidade antioxidante.

Filmes aditivados com extratos vegetais geralmente tem a sua cor influenciada pelos pigmentos contidos nos extratos; Bitencourt e colaboradores (2014) evidenciaram que em filmes à base de gelatina adicionados com extrato etanólico de cúrcuma a capacidade antioxidante foi proporcional com a quantidade do extrato adicionada. Além disso, os filmes com maior concentração de extrato apresentaram menores valores de L^* e maiores valores de a^* e b^* , caracterizando uma coloração mais amarelada, compatível com a cor dos pigmentos presentes na cúrcuma. Wang et al. (2013) ao adicionar polifenóis de chá em filmes à base de quitosana, evidenciaram que as melhores propriedades antioxidantes foram exibidas pelos filmes com maior concentração do extrato, bem como maior quantidade de fenólicos e alteração da cor, ou seja, menores valores de L^* e maiores valores de a^* e b^* .

A ANOVA e a análise dos efeitos mostram que os resultados estão bem explicados pelo coeficiente de determinação e pelo F calculado, significativos para $p < 0,05$ (Tabela 3 e Figura 4), respectivamente. Para a capacidade de sequestro do radical DPPH, a concentração de quitosana teve uma influência significativa, o que pode ser esperado, visto que esse polímero apresenta atividade antioxidante (KHARE, BISWAS E SAHOO, 2014), o que

também foi mostrado na figura 5B. Segundo Melo et al. (2008) e Andrade et al. (2015), para classificar um extrato com forte capacidade de sequestro do radical DPPH, o valor deve ser igual ou superior a 70%, portanto os filmes de quitosana contendo o extrato hidroetanólico do resíduo de acerola, apresentaram valores antioxidantes baixos (9,2 à 25,9%).

Esses baixos valores podem ser justificados pela forma utilizada para extração dos fenólicos totais dos filmes, visto que as amostras foram retiradas de vários pontos ao longo do filme que tinha geometria circular e somado a isso, considerando que na elaboração dos filmes empregou-se a técnica *casting* é possível que não tenha ocorrido uma boa dispersão do antioxidante natural pela matriz filmogênica de quitosana. Dessa forma, os compostos fenólicos possivelmente não estariam distribuídos de forma homogênea em toda superfície do filme.

Assim, considerando que o resíduo de acerola tem forte potencial antioxidante (CAETANO et al., 2011; CAETANO et al., 2009), optou-se pela modificação da forma de extração dos compostos fenólicos dos filmes desenvolvidos nos ensaios seguintes (não explicitados nesse trabalho). Vale ressaltar que não existe um procedimento padrão para a extração de fenólicos a partir de filmes. Norajit, Kim e Ryu (2010) para extrair os compostos presentes nos filmes de alginato incorporados com extrato de ginseng, utilizaram amostras de 0,2g que foram misturadas em 5mL de metanol sob agitação vigorosa por 3 horas. Após o procedimento, o sobrenadante foi analisado quanto à capacidade de sequestro. Enquanto que Siripatrawan e Harte (2010) dissolveram 25mg de cada filme em 3mL de água destilada para posterior análise, e Jouki et al. (2014) utilizaram 25mg de cada filme para dissolve-los em 5mL de água destilada.

Tabela 3: ANOVA para a resposta retenção de compostos fenólicos, capacidade de sequestro do radical DPPH e parâmetros de cor (L^* a^* b^*) de filmes de quitosana aditivado com extrato hidroetanólico do resíduo da acerola (EHRA)

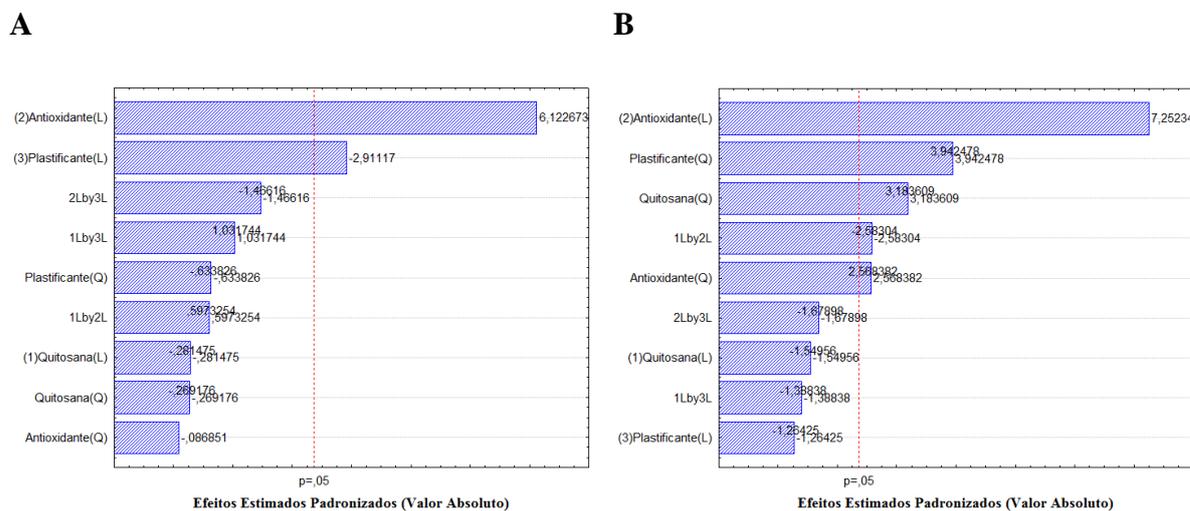
	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F-valor	R ²	R ² _{ajustado}	p-valor
Retenção de Fenólicos							
Regressão	21,212	9	2,357	5,559	0,8773	0,7194	<0,05
Resíduo	2,967	7	0,424				
Total	24,179	16					
DPPH							
Regressão	427,101	9	47,456	9,895	0,9271	0,8334	<0,05
Resíduo	33,573	7	4,796				
Total	460,674	16					
Luminosidade							
Regressão	557,788	9	61,976	10,677	0,9321	0,8448	<0,05
Resíduo	40,633	7	5,805				
Total	598,421	16					
Cor a*							
Regressão	103,786	9	11,532	9,405	0,9217	0,8213	<0,05
Resíduo	8,808	7	1,258				
Total	112,594	16					
Cor b*							
Regressão	2282,443	9	253,605	50,843	0,9845	0,9645	<0,05
Resíduo	34,915	7	4,988				
Total	2247,528	16					

F_{7; 10; 0,05} = 3,14

Em relação ao plastificante, a análise de efeitos apresentada pelo diagrama de Pareto (Figura 4) demonstra que o aumento da concentração do glicerol influenciou na retenção de fenólicos e na capacidade antioxidante dos filmes, o que pode ser explicado pela capacidade que o plastificante tem de modificar a interação entre moléculas (CHIUMARELLI e HUBINGER, 2014). Além disso, as análises com as diversas concentrações de plastificantes demonstraram que os filmes obtidos foram satisfatoriamente manuseáveis (Figura 3A, B e C e D). Sendo assim, pode-se fixar o plastificante na concentração mínima de 0,2% (v/v). Contrariamente, Razavi, Amni e Zahedi (2015) estudando as diferentes concentrações dos plastificantes, sorbitol e glicerol, em algumas características dos filmes, descartaram a

concentração de 0,2% (m/m) por considerá-los frágeis para serem submetidos aos testes, entretanto isto não foi confirmado no presente estudo.

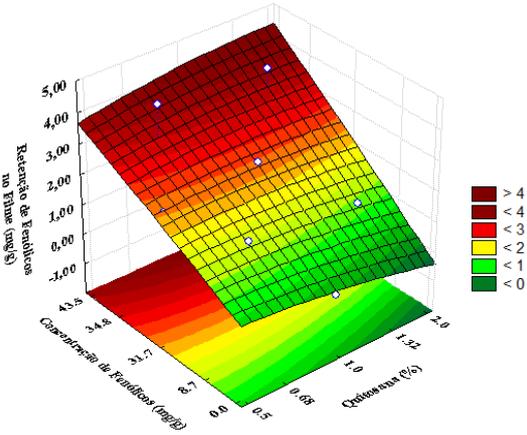
Figura 4- Diagrama de Pareto para (A) Retenção de Fenólicos no Filme e (B) Capacidade Antioxidante para filmes de quitosana/antioxidantes, $p < 0,05$



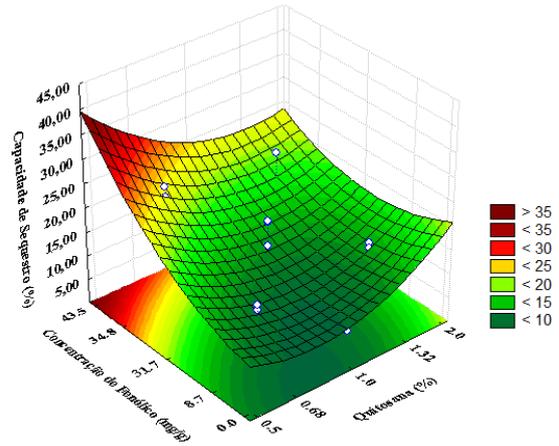
As superfícies de resposta para as variáveis de retenção de fenólicos, potencial antioxidante e parâmetros de cor dos filmes foram construídas e estão apresentadas na Figura 5. Observa-se que para obter uma melhor retenção dos compostos fenólicos no filme necessita-se manter uma relação entre a concentração de quitosana (0,68% a 2,0%) e a concentração do EHRA (8,7 mg/g a 34, 8 mg/g). O aumento da concentração de quitosana e EHRA acima da faixa indicada poderá afetar a capacidade de retenção do filme, pois deve existir um limiar crítico.

Figura 05- Superfícies de respostas para (A) retenção de compostos fenólicos, (B) Capacidade de sequestro do radical DPPH, (C) e parâmetros de cor: Luminosidade, (D) a* e (E) b* em função da concentração de quitosana e de compostos fenólicos do extrato etanólico de acerola.

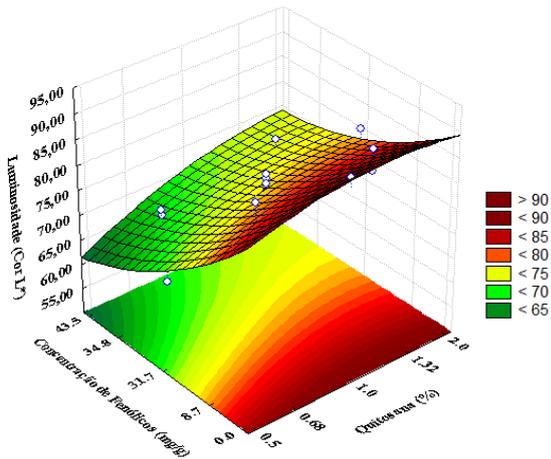
A



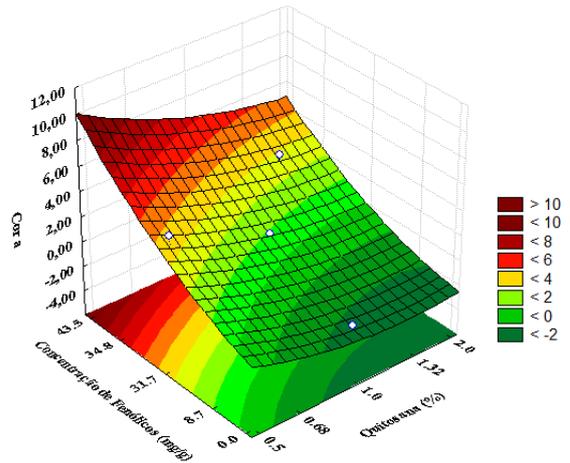
B



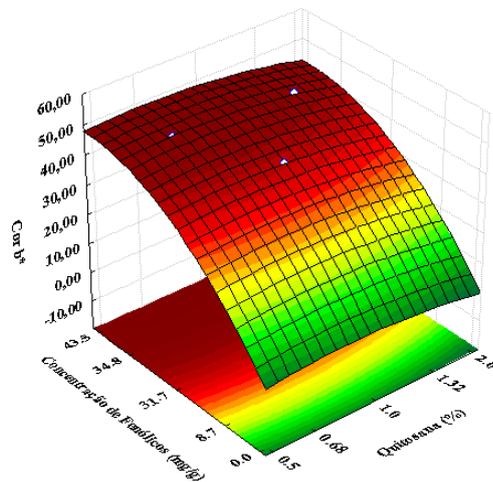
C



D



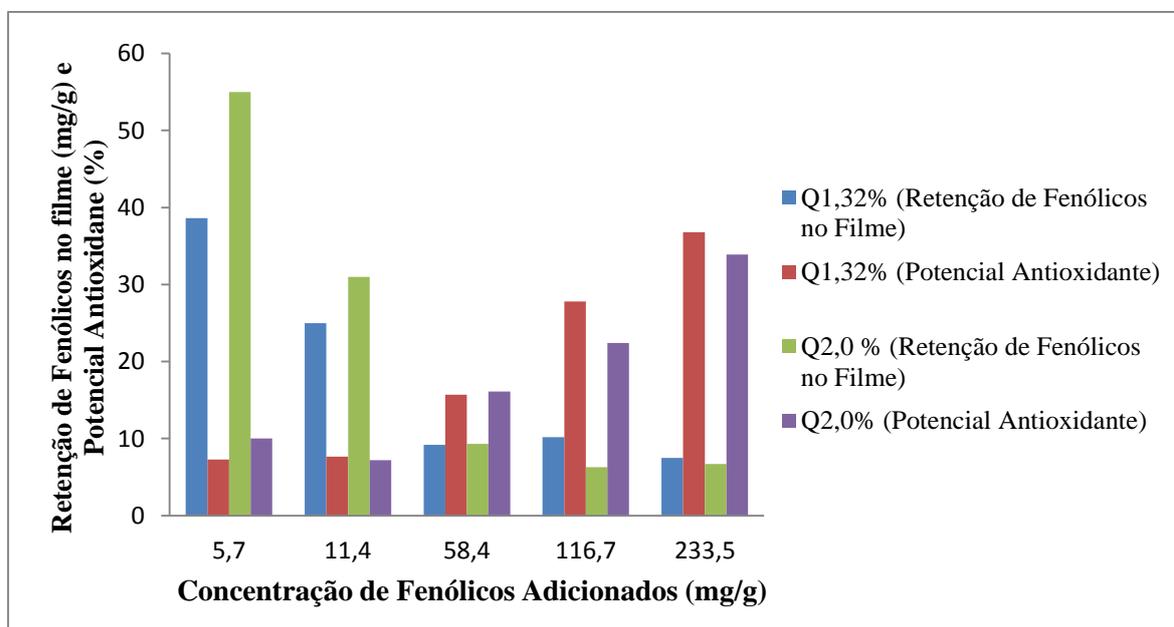
E



Como o volume de glicerol adicionado foi satisfatório no desenvolvimento dos filmes, e da mesma forma que a concentração de quitosana e do extrato do resíduo de acerola apresentou significância estatística, novos ensaios foram conduzidos. Para estes, foi fixado o plastificante na concentração de 0,2% e foram utilizadas as duas concentrações de quitosana (1,32% e 2,00%) que propiciaram a melhor retenção do antioxidante (Figura 5A e 5B). Quanto ao volume do extrato de resíduo da acerola adicionado ao gel, foram utilizados 0,5 a 20 mL, correspondente a 5,7 mg/g a 233,5 mg/g de fenólicos.

Os dados relacionados à capacidade de retenção dos compostos fenólicos e à capacidade de sequestro do radical DPPH do filme estão apresentados na Figura 06. A análise dos dados revela que adicionando os menores volumes do extrato (0,5 a 1,0 mL) se obtém os maiores percentuais de retenção dos compostos fenólicos, independente da concentração de quitosana. No entanto, ao adicionar maiores volumes do extrato (5 a 20 mL) ocorre redução do percentual de retenção, mas aumento da capacidade antioxidante, atingindo valores mais elevados nos filmes com 1,32% de quitosana.

Figura 6-Análise da retenção de fenólicos e da capacidade antioxidante dos filmes à base de quitosana aditivados com extrato hidroetanólico do resíduo da acerola



Segundo Kanatt et al. (2012) o teor de fenólicos totais presentes nos filmes está diretamente relacionada à atividade antioxidante, e a temperatura de extração dos compostos presentes nos filmes pode interferir na sua liberação. Esses autores mostraram que houve

maior liberação dos fenólicos com a temperatura de extração a 37⁰C, quando comparada com a de 28⁰C e 15⁰C. No entanto, os ensaios apresentados no presente trabalho tiveram a extração dos seus compostos a uma temperatura de 23±3⁰C e a liberação dos fenólicos pode ter sido influenciada por esse parâmetro, uma vez que a temperatura utilizada para a extração pode ter sido suficiente para liberação dos fenólicos dos filmes que continham uma menor concentração de extrato, mas não ter sido adequada para liberação desses compostos nos filmes que continham uma maior quantidade do extrato. Babbar et al. (2011) no seu estudo com resíduos de frutos também não encontraram relação entre a quantidade de fenólicos presentes e a atividade antioxidante apresentada, corroborando com os resultados apresentados.

4. CONCLUSÕES

A aplicação da técnica do planejamento experimental DCCR na definição da concentração de quitosana e do extrato hidroetanólico do resíduo de acerola, como antioxidante natural, possibilitou o desenvolvimento de filmes de quitosana com propriedade antioxidante. A flexibilidade exibida pelos filmes foi dependente da relação entre a concentração de quitosana e de EHRA. Todos os filmes apresentaram propriedade antioxidante, entretanto novos estudos devem ser desenvolvidos com o propósito de otimizar o procedimento para a extração dos compostos fenólicos de filmes de quitosana aditivado como o extrato hidroetanólico do resíduo de acerola.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 343-350, 2012.

ANDRADE, R. A. M. D. S., MACIEL, M. I. S., SANTOS, A. M. P., MELO, E. D. A. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35, n. 2, p. 354-360, 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Resolução RDC nº 64, de 16 de setembro de 2008, portalanvisa.gov.br, acessado em 21 de julho de 2015

ARAÚJO, C. R.; BOTELHO, P.S; SILVA, T.M.S.; MACIEL, M.I.S., MELO, E.A., RYAN, S.; SMITH, R. E., Phenolic Compounds and Metals in Tommy Atkins Mango (*Mangifera indica* L) Peels. *The Natural Products Journal*, v.4, n.1, p.2-7, 2014.

ARMENTANO, I., FORTUNATI, E., BURGOS, N., DOMINICI, F., LUZI, F., FIORI, S., KENNY, J. M. Bio-based PLA_PHB plasticized blend films: Processing and structural characterization. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 980-988, 2015.

AVILA-SOSA, R., PALOU, E., MUNGUÍA, M. T. J., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V., CRUZ, A. R. N., LÓPEZ-MALO, A. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International journal of food microbiology**, v. 153, n. 1, p. 66-72, 2012.

BABBAR, N.; Oberoi, H.S.; Uppal, D .S.; Patil,R.T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, v. 44, p. 391–396, 2011.

BENAVIDES, S.; VILLALOBOS-CARVAJAL, R.; REYES, J. E. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 232-239, 2012.

BERENDSEN, R.; GÜELL, C.; HENRY, O.; FERRANDO, M. Premix membrane emulsification to produce oil-in-water emulsions stabilized with various interfacial structures of whey protein and carboxymethyl cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 1-10, 2014.

BITENCOURT, C. M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; SOBRAL, P. J. A.; CARVALHO, R. A. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 145-152, 2014.

BODINI, R. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CARVALHO, R. A. Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.I.S.M; ARAÚJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de Acerola. *Brazilian Journal of Food and Technology*, Campinas, V.12, n.2,p. 155-160,2009.

CAETANO, A.C.S.; ARAÚJO, C.R.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.I.S.; MELO, E.A. Evaluation of antioxidant activity of agro-industrial waste of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit extracts. *Journal of Food Science and Technology – Campinas*, v31, n.3, p.769-775, 2011.

CHIUMARELLI, M., e HUBINGER, M. D. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food hydrocolloids**, v. 38, p. 20-27, 2014

DAINELLI, D., GONTARD, N., SPYROPOULOS, D., ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN, E., TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. S103-S112, 2008.

DAS, D. K.; DUTTA, H., MAHANTA, C. L. Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 272-278, 2013.

DE ALMEIDA MELO, E., MACIEL, M. I. S., DE LIMA, V. L. A. G., DO NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, 2008.

EMIROĞLU, Z. K.; YEMIŞ, G. P.; COŞKUN, B. K.; CANDOĞAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283-288, 2010.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; OCIO, M. J.; LAGARON, J. M. Antibacterial chitosan-based blends with ethylene–vinyl alcohol copolymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 874-884, 2010.

GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., CATALÁ, R., GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 42-51, 2014.

HAMBLETON, A.; DEBEAUFORT, F.; BONNOTTE, A.; VOILLEY, A. Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2116-2124, 2009.

JOUKI, M.; YAZDI, F. T.; MORTAZAVI, S. A.; KOOCHEKI, A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, 2014.

KANATT, S. R., RAO, M. S., CHAWLA, S. P., SHARMA, A. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 290-297, 2012.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.

LI, J. H., MIAO, J., WU, J. L., CHEN, S. F., ZHANG, Q. Q. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166-173, 2014.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., GÓMEZ-ESTACA, J., CATALÁ, R., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1376-1384, 2012.

MA, W., TANG, C. H., YANG, X. Q., YIN, S. W. Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate–chitosan composite films at acidic pH. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 237-247, 2013.

NGAH, W. W., TEONG, L. C., HANAFIAH, M. A. K. M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1446-1456, 2011.

NORAJIT, K.; KIM, Ki M.; RYU, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377-384, 2010.

PERUMALLA, A. V. S., HETTIARACHCHY, N. S. NAVAM S. Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

RAZAVI, S. M. A., AMINI, A. M., e ZAHEDI, Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 290-298, 2015.

RODRIGUES, M.I; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos & otimização de processos. 3ª ed. Ed. Cárita, Campinas-SP, 2014. 358p

RUBILAR, J. F.; CRUZ, R. M.; SILVA, H. D.; VICENTE, A. A., KHMELINSKII, I.; VIEIRA, M. C. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 466-474, 2013.

SHOJAEI-ALIABADI, S., HOSSEINI, H., MOHAMMADIFAR, M. A., MOHAMMADI, A., GHASEMLOU, M., OJAGH, S. M., KHAKSAR, R. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -Carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. **International journal of biological macromolecules**, v. 52, p. 116-124, 2013.

SILVA, R.C.O.; MOREIRA, A.C.C.G; NASCIMENTO, J.D.M.; Maciel, M.I.S.; Melo, E.A. Antioxidant Potential of Extracts of Cajá-Umbu Peels. *The Natural Products Journal*, v.2, n2, p. 149-154, 2012

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 770-775, 2010.

VAN DEN BROEK, L. A.; KNOOP, R. J.; KAPPEN, F. H.; BOERIU, C. G. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 237-242, 2015.

WANG, L.; DONG, Y., MEN, H., TONG, J.; ZHOU, J. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2013.

WANG, H.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; JIANG, S.; LIU, H.; SUN, M.; JIANG, S. Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly (vinyl alcohol). **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 64-71, 2015.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1801-1812, 1999.

WU, J.; CHEN, S.; GE, S.; MIAO, J.; LI, J.; ZHANG, Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 42-51, 2013.

YOSHIDA, C. M. P., E ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 420-430, 2009.

YOSHIDA, C. M., MACIEL, V. B. V., MENDONÇA, M. E. D., FRANCO, T. T Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 83-89, 2014.

ZINOVIADOU, K. G., KOUTSOUMANIS, K. P., BILIADERIS, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, v. 82, n. 3, p. 338-345, 2009.

Artigo 2

Filme bioativo de quitosana aditivado com extrato do resíduo agrícola de acerola como composto bioativo antioxidante

Sydia Darcila Oliveira Machado, Cristiana Maria Pedroso Yoshida, Enayde de Almeida Melo, Andreлина Maria Pinheiro Santos

RESUMO

A conscientização pela preservação do ambiente e da saúde tornaram os consumidores mais exigentes, e as indústrias alimentícias precisam atender essa demanda. Os materiais de embalagens mais usados habitualmente não são de fácil biodegradação podendo causar um impacto negativo ao ambiente e a quitosana pela sua propriedade de formar filmes e ser de fácil biodegradabilidade, mostra ser adequada como matéria-prima de embalagens. A incorporação de compostos antioxidantes no material de embalagem formam filmes com capacidade de prevenir reações deteriorativas de oxidação em alimentos, evitando efeitos prejudiciais à saúde. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um filme com características ativas, a partir de materiais biodegradáveis, quitosana e extrato de resíduo agroindustrial. Filmes com 1,32% de quitosana (m/v) incorporados com 20% (v/v) do extrato antioxidante de resíduo de acerola foram desenvolvidos e caracterizados. Os filmes ativos de quitosana apresentaram aspecto visual homogêneo, barreira à luz, potencial antioxidante estável por um período de quinze dias, porém com estrutura frágil. Os filmes ativos apresentaram características valiosas para a preservação dos alimentos, mas outros estudos são necessários para conhecer o comportamento deles quando aplicados ao alimento.

Palavras-chave: Quitosana, embalagem ativa, composto bioativo antioxidante, resíduos agrícolas de acerola

ABSTRACT

The awareness to preserve the environment and health become the most demanding consumers and food manufacturers need to meet this demand. The materials most used packages are not usually easy biodegradation may cause a negative impact to the environment and chitosan for its property of forming films and be ready biodegradability, proves to be suitable as a raw material for packaging. The incorporation of antioxidants in the packaging material with film-forming ability to prevent spoilage oxidation reactions in foods, to avoid harmful effects to health. The aim of this study was to develop a film with active features, from biodegradable materials, chitosan and agro-industrial residue extract. Films with 1.32% chitosan (w / v) incorporated with 20% (v / v) of acerola residue antioxidant extract were developed and characterized. The chitosan-active films had homogeneous visual appearance, light barrier, stable antioxidant potential for a period of fifteen days, but with fragile structure. Assets films presented valuable features for the preservation of food, but further studies are required to know their behavior when applied to food.

Keywords: Chitosan, active packaging, antioxidant bioactive compound, agricultural waste acerola

1. INTRODUÇÃO

Com o propósito de atender as tendências de mercado, pela demanda por alimentos seguros, sustentáveis e com potenciais benefícios à saúde, a elaboração de embalagens ativas produzidas com matéria-prima biodegradável, mostra ser uma tecnologia bastante promissora para indústria de alimentos, para o meio ambiente e para o consumidor (JOUKI et al., 2014; CRUZ-ROMERO et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010).

Nas embalagens ativas um aditivo, que pode ser agentes naturais, agentes antioxidantes ou antimicrobianos, é incorporado diretamente às embalagens (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; LÓPEZ DE DICASTILLO et al., 2012;) ou em materiais separados sob a forma de sachê, por exemplo (DAINELLI et al., 2008), atuando na liberação ou absorção de substâncias, podendo prolongar a vida de prateleira do alimento (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; LÓPEZ DE DICASTILLO et al., 2012; DAINELLI et al., 2008). No entanto, o impacto negativo causado pelos resíduos de materiais não facilmente biodegradáveis utilizados na fabricação de embalagens desperta o interesse na substituição dessas matérias-primas (ELSABEE e ABDU, 2013; SUNG et al., 2013; MARTINS, CERQUEIRA e VICENTE, 2012). Dessa forma, vem aumentando o interesse no desenvolvimento de embalagens que sejam produzidas com materiais facilmente biodegradáveis e não-tóxicos (DANG e YOKSAN, 2015; NORONHA et al., 2014; ELSABEE e ABDU, 2013; SUNG et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010).

Pelas suas características alguns polímeros naturais podem ser utilizados como material de embalagem (LECETA et al., 2015; ELSABEE e ABDU, 2013; SUNG et al., 2013), assim como a quitosana, que é um polissacarídeo policatiônico, composto estruturalmente por ligações β -(1-4)-2-acetamido-D-glicose e β -(1-4)-2-amino-D-glicose. É originado a partir da desacetilação da quitina e pelo seu potencial de biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, vem sendo bastante promissor para indústria de alimentos e contribui com a preservação da qualidade do alimento, atendendo às demais exigências para uma embalagem (CRUZ-ROMERO et al., 2013; CASETTARI et al., 2012; MARTINS, CERQUEIRA e VICENTE, 2012; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010; DUTTA et al., 2009).

Quanto aos compostos incorporados como agentes nas embalagens, atualmente existe uma tendência de utilização de antioxidantes naturais, visto que os sintéticos estão sendo preteridos devido a sua toxicidade e potencial carcinogênico, quando ingeridos em

concentrações elevadas (LI et al., 2014; WU et al., 2013; LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012; SAMPAIO et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Além de que os componentes naturais, na sua grande maioria, oferecem benefícios múltiplos à saúde (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012), conseqüentemente, vem aumentando o interesse da indústria de alimentos na utilização desses compostos provenientes de produtos naturais (SOUZA et al., 2011; MEZADRI et al., 2008). Esses compostos podem ser facilmente obtidos a partir de frutas e hortaliças e dos seus resíduos (cascas e sementes), que representam em torno de 25 a 30% dos vegetais (AYALA-ZAVALA et al., 2010), que geralmente são descartados ou subutilizados (DA SILVA et al., 2014; MOO-HUCHIN et al., 2014; BABBAR et al., 2011).

Portanto, o aproveitamento desses subprodutos como matérias-primas para agentes de embalagens, contribui para a recuperação de um produto que seria desperdiçado, conduzindo a indústria à um agronegócio mais lucrativo, significando um impacto ambiental positivo e uma maior rentabilidade econômica (DA SILVA et al., 2014). Assim, esse estudo objetivou desenvolver um filme biodegradável a partir da quitosana, com propriedades ativas antioxidantes obtidas a partir de subprodutos agrícolas (resíduo da acerola), levando em consideração o uso da tecnologia para alcançar a eficiência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

As matérias-primas utilizadas para a preparação dos filmes foram: quitosana de peso molecular médio (SIGMA-ALDRICH chemistry), glicerol (NUCLEAR), e o extrato obtido a partir da farinha de resíduo da acerola proveniente da indústria agrícola. O solvente utilizado foi a solução de ácido acético glacial (DINÂMICA).

O projeto foi desenvolvido no laboratório do Departamento de Ciências Domésticas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e dois testes (propriedades mecânicas e a Análise de infravermelho com transformada de Fourier) foram realizados no laboratório de polímeros pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco (DEQ/UFPE).

2.2 Obtenção do extrato hidroetanólico do resíduo da acerola

Os compostos fenólicos foram extraídos da farinha produzida a partir de resíduos de sementes, resquícios de polpa e casca da acerola. Foram pesadas 20g da farinha, para terem seus compostos extraídos em 200 ml de solução etanólica (60%), durante 30 minutos

em agitação (400rpm). O extrato foi centrifugado e o volume final foi rotoevaporizado para 50 mL, sendo em seguida armazenados a temperatura de -22⁰C para análises e aplicações posteriores.

2.3 Seleção dos filmes

A partir de testes preliminares, realizados para análise da atividade antioxidante, foram conduzidos novos ensaios utilizando duas concentrações de quitosana (1,32% e 2,00%, m/v) e três volumes do extrato (5%, 10% e 20%, v/v), o que totalizou seis tipos de filmes e a partir desses foi indicado o que seria utilizado para os testes seguintes.

2.4 Preparação dos filmes

Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*, onde a solução de quitosana foi preparada com solução aquosa de ácido acético glacial (0,5%, v/v). A solução foi agitada magneticamente, por 60 minutos, a uma velocidade de 1000rpm e à temperatura ambiente (23±3⁰C). O plastificante e o extrato hidroetanólico do resíduo da acerola foram adicionados nos últimos 15 e 10 minutos, respectivamente. A solução foi aplicada em suportes planos, circulares (Placas de Petri, 150 x15mm) com massa fixa de 70±2g. E em seguida, procedeu-se o processo de secagem a 30±2⁰C em estufa com circulação de ar (MA035-MARCONI) por 48 horas. Os filmes foram armazenados em dessecador, contendo sílica gel, por 30 dias para posterior análise.

2.5 Determinação da espessura, densidade e teor de umidade

A espessura do filme foi medida com a utilização de um micrômetro manual (Mitutoyo/micrometer- Japão) com 0,001mm de precisão. Foram realizadas cinco medições, quadrante e ponto central e os valores médios foram utilizados para os cálculos da opacidade e densidade. A densidade foi determinada pelo peso da amostra e volume (produto da área e espessura do filme). E o teor umidade foi determinada pela perda de peso das amostras, acondicionadas em estufa a 105±3⁰C, durante 24 horas, sendo calculado pela Eq1.

$$x(\%) = \frac{\text{massai} - \text{massaf}}{\text{massai}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde X é o teor de umidade dos filmes (%), m_i é a massa inicial do filme úmido, m_f é a massa final do filme seco.

2.6 Parâmetro de cor e opacidade dos filmes

A análise instrumental da cor foi realizada por meio da colorimetria de triestímulos, no sistema CIE Lab, utilizando um colorímetro CHROMA METER CR-400 (Konica Minolta®, Japão) no modo de refletância, e o iluminante C. A cor, expressa no sistema CIE Lab ($L^*a^*b^*$), é especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares: o eixo “L” (luminosidade) que varia do preto (0%) ao branco (100%); o eixo “a”, do verde (-a) ao vermelho (+a) e o eixo “b”, do azul (-b) ao amarelo (+b). Para a determinação dos parâmetros da cor, os filmes foram sobrepostos em uma placa branca, as leituras de L^* ; a^* e b^* foram efetuadas em 5 (cinco) diferentes pontos dos filmes, e os dados submetidos ao cálculo da média aritmética.

A metodologia para determinar a opacidade dos filmes foi baseada em Siripatrawan e Harte (2010). As amostras dos filmes (10,0 cm de comprimento x 1,5 cm de largura) foram posicionados no local da cubeta de modo perpendicular ao feixe de luz. A leitura foi realizada em triplicata, no comprimento de onda de 600nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) e a opacidade foi calculada conforme a Eq 2.

$$O = \frac{ABS_{600}}{T} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde ABS_{600} é a absorção a 600 nm e T é a espessura do filme em mm.

2.7 Transmissão de luz

As propriedades de barreira de luz visíveis dos filmes foram medidos em comprimentos de onda selecionados entre 200 e 800nm, utilizando-se o espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC), de acordo com o procedimento referido por Fang et al. (2002). As amostras dos filmes (10 cm de comprimento x 1,5 cm de largura) foram levados ao equipamento e alocados no local da cubeta de modo perpendicular ao feixe de luz. A análise de Transmissão de luz foi feita em triplicata.

2.8 Análise de infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)

As análises de espectroscopia no infravermelho (FTIR) foram realizadas no espectrômetro Bruker Tensor 27 equipado com o Platinum ATR (Reflexão total atenuada). Para a medição, a sonda tocou diretamente a superfície das películas. Os espectros foram obtidos numa faixa espectral de 4000 a 650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , com sobreposição de 16 varreduras. Os dados foram analisados pelo software Opus.

2.9 Propriedades mecânicas

Para a determinação das propriedades mecânicas (resistência à tração e porcentagem de alongamento na ruptura, adaptou-se a metodologia descrita ASTM D882-10 (2010), sendo utilizado o equipamento LINHA DL-500 MF-MARCA:EMIC[®]. No teste de tração, os filmes foram dimensionados em corpos de prova com 7,5 cm de comprimento e 2,5cm de largura. Estes corpos de prova foram fixados nas garras do equipamento com distância inicial entre elas de 30mm e a velocidade de tração de 0,5mm/s. A tensão na ruptura foi determinada pela relação entre força e área da seção transversal inicial do filme. Os resultados foram analisados em triplicata.

2.10 Extração dos compostos presentes nos filmes

Essa etapa foi baseada na metodologia seguida por Wang et al. (2013), com algumas adaptações. As amostras dos filmes (5g) foram solubilizadas em 25mL de solução etanólica (60%) e colocados em agitação (Agitador magnético-TECNAL) na velocidade de 1000 rpm, durante 1 minuto. O sobrenadante foi utilizado para determinação dos fenólicos totais e da atividade antioxidante. O tempo de agitação foi definido a partir de testes preliminares com diferentes intervalos de tempos (1, 2, 5, 7 e 10 minutos), sendo definido o de 1 minuto.

2.11 Determinação de fenólicos totais

Os fenólicos totais dos compostos extraídos dos filmes foram mensurados por método espectrofotométrico com espectro de absorção registrado no comprimento de onda de 725nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck), segundo metodologia descrita por Wettasinghe e Shahidi (1999) e curva padrão de ácido gálico (10 a 120 $\mu\text{g/mL}$, com $R^2 = 0,9997$). Onde 0,5 mL do extrato foi misturado com 8 mL de água destilada e 0,5 ml do reagente, sendo a mistura incubada por 3 minutos antes da adição de 1,0 ml da solução saturada de carbonato de sódio. Após 1 hora

de repouso em ambiente escuro, foi realizada a leitura e os resultados foram expressos em mg de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico (EAG)/g do filme. Para a determinação dos fenólicos presentes nos filmes, seguiu-se a Eq.3:

$$T = \frac{C \times V}{M} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde T é o conteúdo total de fenólicos, em miligramas por grama de filme seco; C é a concentração de ácido gálico estabelecida a partir da curva de calibração em miligrama por mililitro; V é o volume de filme do extrato, em mililitro e M é o peso do filme seco, em grama, conforme descrito por Moradi et al.(2012).

2.12 Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos filmes de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH), foi avaliada segundo método descrito por Brand-Williams et al. (1995), com algumas adaptações. Uma alíquota de 0,5mL da solução extraída dos filmes, adicionados de 2,5mL da solução de radical DPPH (6×10^{-5} mol/L), ajustada para uma absorbância entre 0,7 a 0,8, foi colocada na cubeta para o sequestro dos radicais. As leituras da absorbância foram realizadas, até a solução ter sido estabilizada (30 minutos) em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650PC) a 517 nm, em triplicata. A capacidade antioxidante foi calculada pela Eq. 4:

$$\% \text{ de sequestro} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100 \quad (\text{Eq.4})$$

Onde a absorbância do controle é referente à solução de DPPH sem a presença do extrato e a absorbância da amostra é referente à absorbância da reação da solução de DPPH com o extrato.

Para a análise da cinética foi seguido o mesmo procedimento descrito, sendo que num intervalo de tempo de 48 a 72 h, num intervalo de tempo de 15 dias, onde os filmes permaneceram armazenados a uma temperatura 26 ± 2 °C de e umidade relativa de $37 \pm 3\%$.

2.13 Estatística

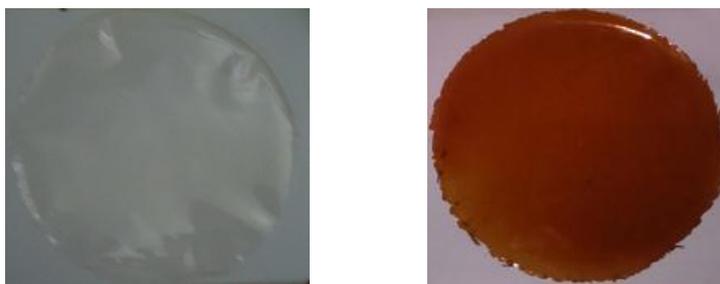
A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.0. Valores foram expressos em média \pm desvio padrão. O teste t de *Student* e teste de *Duncan* foram aplicados para comparação das médias, diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos filmes

Os filmes de quitosana contendo o extrato antioxidante de acerola apresentaram coloração vermelha, boa flexibilidade, sendo fácil retirar do suporte plano, boa manuseabilidade (Figura 1). Completa homogeneização do extrato hidroetanólico do resíduo da acerola (EHRA) na matriz filmogênica de quitosana foi observada, resultando em filmes sem partículas insolúveis e com boa distribuição do extrato (Figura 1b).

Figura 1-a) filme de quitosana (1,32%, m/v), b) filme de quitosana (1,32%, m/v) incorporado por 20% (v/v) do extrato hidroetanólico do resíduo da acerola.



O extrato EHRA utilizado como fonte de antioxidantes foi oriundo de subprodutos da agroindústria, seguindo a proposta de desenvolver um material atrativo para indústria tanto pelo seu custo, como pelo seu benefício.

No processo de escolha do material para uma embalagem ativa e com potencial antioxidante, deve ser considerado a natureza do polímero e do composto utilizado como antioxidante, pois é necessário que exista compatibilidade entre ambos, a fim de ser obtida uma distribuição homogênea e para que os coeficientes de partição do antioxidante, possam favorecer a sua liberação para o alimento ou embalagem nas diferentes fases (GÓMEZ-ESTACA et al., 2014). Assim, tanto a combinação, como a compatibilidade dos compostos são importantes na determinação das propriedades mecânicas e de barreira do filme desenvolvido (FALGUERA et al., 2011).

Duas concentrações de quitosana foram estudadas para a formação dos filmes contendo 3 diferentes concentrações de EHRA (5, 10 e 20%, v/v). A análise da capacidade antioxidante dos filmes foi expressa em percentual de capacidade de sequestro do radical (método DPPH) incorporados com o resíduo agroindustrial (Tabela 1).

Tabela 1-Atividade antioxidante dos filmes com diferentes concentrações de EHRA (extrato hidroetanólico de resíduo de acerola) e de quitosana

Quitosana (%)	% Sequestro DPPH				
	EHRA	0%	5%	10%	20%
1,32		4,61±0,51 ^{dA}	15,72±0,84 ^{c A}	27,83±0,11 ^{b A}	36,81±0,32 ^{a A}
2,00		5,63±0,28 ^{dA}	16,11±0,05 ^{c A}	22,42±0,05 ^{b B}	33,93±0,41 ^{a B}

Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Médias na mesma linha seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As médias na mesma coluna seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste “t” de student ($p < 0,05$).

A maior capacidade antioxidante dos filmes ativos de quitosana, representada pelo maior valor de percentual de capacidade de sequestro do radical (% sequestro DPPH) foi para os filmes contendo 20% de EHRA incorporado em 1,32% de quitosana. Desta forma, esta condição foi selecionada para dar continuidade ao estudo. Estes resultados foram concordantes com o descrito por alguns autores (LIU et al., 2013; MORADI et al., 2012; GÓMEZ-ESTACA et al., 2009) que referiram que o grau da capacidade antioxidante geralmente tem relação direta com a quantidade de antioxidantes adicionada ao filme. Apesar do potencial antioxidante próprio da quitosana, em todos os ensaios houve uma melhoria dessa propriedade, corroborando com os resultados encontrados por NORAJIT et al. (2010), BITECOURT et al. (2014) e FERREIRA et al. (2014) que indicaram uma maior capacidade de sequestro de radicais livres, quando os filmes, de diferentes matrizes, foram aditivados com antioxidantes naturais, comparados a filmes sem esses agentes incorporados.

3.2 Caracterização dos filmes ativos

Os filmes ativos de quitosana foram caracterizados quanto a espessura, densidade, teor de umidade (Tabela 2). As espessura dos filmes contendo EHRA não apresentaram diferença significativa quando comparado ao filme de quitosana pura, embora a quantidade de sólidos totais tenha sido maior no filme teste, sugerindo eficiência no controle desse

parâmetro, na formação do filme no suporte plano. Segundo Ravazi, Amini e Zahedi (2015) o tipo e a quantidade do plastificante também podem influenciar na espessura dos filmes poliméricos, entretanto não foi o que aconteceu nesse trabalho. Os resultados sugerem que os compostos fenólicos podem ser distribuídos na matriz do filme sem alterar a espessura de forma significativa.

Tabela 2- Espessura, densidade e umidade dos filmes à base de quitosana

Filmes	EHRA (%)	Espessura (mm)	Densidade (g cm⁻³)	Umidade (%)
Quitosana	0	0,07±0,01 ^a	1,26±0,21 ^a	9,40±0,40 ^b
Quitosana/EHRA	20	0,09±0,01 ^a	1,31±0,09 ^a	12,40±0,11 ^a

Os valores são apresentados como média e desvio padrão. As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste “t” de student (p< 0,05).

Quanto à densidade, também não foi observada diferença significativa entre os filmes, porém o que contém EHRA apresentou-se um pouco mais denso. Siripatrawan e Harte (2010) afirmaram que ocorrem ligações, pontes de hidrogênio e ligações covalentes, entre os compostos fenólicos e a matriz de quitosana, conseqüentemente com novas interações intermoleculares, resultam no aumento da densidade do filme. Corroborando com os resultados Wang et al. (2013) que não encontraram alterações significativas desse parâmetro.

Segundo Cerqueira et al. (2012), a determinação do teor de umidade dos filmes, indica a quantidade de água que está contida neles. Estando também relacionado com os espaços vazios entre as moléculas da microestrutura do biofilme que podem ser preenchidos por moléculas de água (RUBILAR et al., 2013; PEREDA et al., 2011). Cerqueira et al. (2012) referem que a quantidade desse componente nos filmes é também dependente do volume de glicerol presente, que devido à sua natureza hidrofílica retém a água na matriz do filme, aumentando a interação entre elas. O que pode explicar a baixa umidade dos filmes desenvolvidos, visto que quando comparados a outros trabalhos (PENG e LI, 2014; WANG et al., 2013), a quantidade de plastificante utilizada foi em torno de 50% menor, revelando filmes mais secos.

Ao comparar o filme de quitosana com o aditivado com EHRA evidencia-se diferença significativa entre os valores, observando maior umidade no filme contendo EHRA, na ordem de 20%. Martins, Cerqueira e Vicente (2012) obtiveram resultados contrários com filmes de quitosana incorporados com tocoferol, reduzindo o teor de umidade nos filmes sendo associado à natureza hidrofóbica do componente adicionado. O estudo de Peng e Li (2014) reafirmou a atuação dos componentes hidrofóbicos no controle da umidade do filme, quando trabalharam com óleos essenciais (de limão, tomilho e canela) incorporados na matriz de quitosana, e identificaram um aumento da tortuosidade da estrutura do polímero, que foi responsável pelo distanciamento das moléculas de água do filme.

Os óleos essenciais formam ligações covalentes com os grupos funcionais do polímero, conduzindo à diminuição da disponibilidade de grupos hidroxilas e aminas, limitando assim a interação com a água por pontes de hidrogênio (OJAGH et al., 2010). Assim, substratos com características hidrofóbicas quando incorporados à matriz dos polímeros, tendem a interromper a ponte de hidrogênio do polímero com a molécula de água, aumentando essa propriedade de barreira.

Como o aditivo utilizado no presente trabalho (EHRA), consistia em um extrato alcoólico do resíduo da acerola, que tem características hidrofílicas, houve um comportamento diferente dessa propriedade, o que pode explicar o aumento da umidade constatada. Esse indício corrobora com os resultados encontrados por Rubilar et al. (2013), que desenvolveram três tipos de filmes à base de quitosana, mostrando um maior teor de umidade (14,87%) no que apresentava caráter hidrofílico (extrato de semente de uva). Além disso, a quitosana apresenta natureza hidrofílica, e tem uma disponibilidade de grupos hidrofílicos, que encontrando-se livres, permitem interações das moléculas de água com a matriz (KHOSHGOZARAN-ABRAS et al., 2012).

3.3 Parâmetros de cor e opacidade

A cor de uma embalagem tem importância para aceitação ou rejeição do produto pelo consumidor (CHENG et al., 2015; OJAGH et al., 2010). Os valores dos parâmetros das cores encontrados estão de acordo com o aspecto vermelho dos filmes. Como observado na Tabela 3. O decréscimo do valor do parâmetro L^* , indica a influência do extrato no escurecimento do filme. Ademais, com a incorporação do EHRA, houve aumento dos valores de a^* e b^* , evidenciando uma tendência para o vermelho e amarelo, que condizem

com a coloração inicial do extrato que é proveniente de resíduos de acerola. Todas alterações apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Sem a adição do EHRA, o filme mostrou-se mais transparente e com uma tendência maior para o amarelo, que é característico de filmes de quitosana. Esses resultados mostraram concordância com estudos reportados na literatura baseados em filmes de quitosana, como o de Siripatrawan e Harte, 2010; Khoshgozaran-Abras et al., 2012; Wang et al., 2013, quando adicionaram, respectivamente, extrato do chá verde, gel de *Aloe vera* e polifenóis de chá aos filmes.

As alterações de cor observadas nesse trabalho podem ser justificadas pela presença dos compostos presentes no extrato do resíduo de acerola, tais como as antocianinas e os carotenóides. Segundo Lima et al. (2011), grande parte da coloração da acerola é devida à presença das antocianinas e Mezadri et al. (2008) referiram 17 pigmentos carotenóides presentes na acerola, representando entre 3,2 e 406,0 mg kg⁻¹ do fruto, sendo que o β -caroteno representa a maior parcela (40-60%); como também a presença dos flavonóides, onde os dois principais são as antocianinas (37,9–597,4mg kg⁻¹) e os flavonóis (70–185mg kg⁻¹) e também identificaram um flavonol (quercetina). Corroborando os resultados, Rubilar e seus colaboradores (2013) com a adição de carvacrol e extrato de sementes de uva na matriz de quitosana, justificaram a redução da transparência dos filmes pelos pigmentos pro-antocianidinas dos compostos utilizados como aditivos.

Tabela 3-Efeito da adição do extrato de resíduo agroindustrial na Luminosidade (L*), croma a*, croma b* e da opacidade (OP) nos filmes à base de quitosana

Filmes	Concentração EHRA	L*	a*	b*	OP
Quitosana	0%	90,23±1,24 ^a	1,22±0,02 ^b	4,95±0,32 ^b	3,44±0,12 ^b
Quitosana/EHRA	20%	43,93±2,92 ^b	25,93±1,72 ^a	36,15±8,01 ^a	7,85±0,41 ^a

Os valores são apresentados como média e desvio padrão. As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste “t” de student (p< 0,05).

A opacidade (OP) representa uma relação inversa com a transparência, e essa propriedade pode atuar na prevenção da deterioração dos alimentos provocada pela exposição à luz e ultravioleta (UV) (MA et al., 2013). Observou-se uma diferença significativa entre os filmes com e sem EHRA. Após a incorporação do EHRA, o filme apresentou uma maior opacidade, o que era esperado visto que a transparência reduziu com a concentração de EHRA. O resultado corrobora com o encontrado por Wang e seus colaboradores (2013), em filmes de quitosana incorporados com polifenóis que mostraram-se mais opacos quando comparados ao controle, e quanto maior a concentração do extrato, maior foi a opacidade apresentada, da mesma forma que Siripatrawan e Harte (2010) que incorporaram chá verde na matriz de quitosana.

Na análise da OP do filme de quitosana, obteve-se valores superiores quando comparado a outros trabalhos. Segundo Santacruz e Castro (2015), estas variações podem estar relacionadas com peso molecular da matriz, com o tempo de agitação utilizado para preparação dos filmes. Podendo também ter interferência devido a diferença entre as fontes de quitosana e o seu método de obtenção também pode ser um possível interferente dessas características (WAHAB; ABDU, 2010; ARANAZ et al., 2009).

3.4 Transmissão de luz

Embalagens destinadas a certos alimentos requerem uma boa propriedade de barreira à luz, a fim de evitar a oxidação (LI et al., 2014), e poder estender a vida comercial do produto. Isso porque a luz é um dos fatores externos que quando está presente no processo de perda de um átomo de hidrogênio (H_2), contido num ácido graxo insaturado, reagindo com o oxigênio (O_2), pode conduzir ao início do mecanismo de oxidação lipídica do alimento (PERUMALLA e HETTIARACHCHY, 2011). Daí a importância de uma boa proteção à esse fator externo que envolve reações dos radicais presentes no ar, com a incorporação de pigmentos ao filme que podem reduzir significativamente o efeito desse agente (DUTTA et al., 2009).

Os resultados da transmissão da luz através dos filmes estão apresentados na Tabela 4. Diferentes perfis de proteção foram verificados tanto à luz UV (250-300nm) como à visível (350-700nm), revelando uma baixa transmissão de luz pelo filme incorporado com o EHRA, quando comparado ao controle, mostrando uma transmissão de, aproximadamente, 0,7% a 500nm, no filme sem o EHRA, era de, aproximadamente, 47%, sugerindo um potencial de barreira à oxidação induzida pela luz UV. Esse resultado pode ser explicado

pela presença dos compostos fenólicos presente no filme aditivado com o EHRA, pois os anéis benzenos da sua estrutura, contribuem com a modificação na transmissão da luz (BITENCOURT et al., 2014; LI et al., 2014; WANG et al., 2013) e também podem ter sofrido a influência do peso molecular da matriz utilizada (LECETA et al., 2013).

Tabela 4-Interferência na transmissão da luz (%T) pela adição do extrato hidroetanólico de resíduo de acerola (EHRA) nos filmes de quitosana.

Filmes	EHRA (%)	Comprimento de onda (nm)						
		200	350	400	500	600	700	800
Quitosana	0	0,02±	28,31	36,63±	46,82±	51,21±	54,3±	62,82±
		0,01 ^a	±4,92 ^a	5,13 ^a	4,35 ^a	3,82 ^a	3,52 ^a	4,32 ^a
Quitosana/ EHRA	20	0,00±	0,00±	0,061±	0,70±	17,57±	44,2±	60,14±
		0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,58 ^b	3,81 ^b	2,61 ^b	1,53 ^a

Os valores são apresentados como média e desvio padrão. As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste “t” de student ($p < 0,05$).

Comportamento similar foi observado por Martins, Cerqueira e Vicente (2012), com a incorporação de α -tocoferol em filmes à base de quitosana, e em outros estudos com outras matrizes, tais como o de Norajit, Kim e Ryu (2010), que trabalharam com matriz de alginato incorporada com extrato de ginseng; os de Wu et al. (2013), Bitencourt et al. (2014) e Li et al. (2014) que trabalharam com filmes de gelatina, incorporados com extrato de chá verde, extrato etanólico de cúrcuma e compostos antioxidantes (extrato da semente de uva, polifenóis de uva, extrato de gengibre, extrato da folha de gingko e extrato de chá verde), respectivamente.

Os resultados indicaram que embalagens aditivadas com o extrato de resíduo de acerola, o EHRA, podem auxiliar na redução da velocidade da oxidação estimulada pela radiação da luz, em alimentos que contenha algum componente sensível à esse fator, tanto pela propriedade de barreira apresentada, como pelo grau de opacidade. Desta forma, podem ser adequados para utilizar como embalagens de alimentos que contenham lipídios insaturados em sua composição (LI et al., 2014), antocianinas em sua estrutura (pigmento facilmente degradado pela luz) (MERCALI et al., 2013), entre outros.

3.5 ATR-FTIR

A interação entre a quitosana e o EHRA foi caracterizada pela análise qualitativa FTIR, mostrada na Figura 3. Essa análise foi realizada para uma melhor compreensão dos efeitos do EHRA na matriz polimérica, pois quando existe mistura física entre componentes podem ocorrer modificações na estrutura química da matriz (WANG et al., 2013). O FTIR é uma técnica bastante eficiente na detecção da estrutura das moléculas de polissacarídeos, proteínas, como também de misturas, quando ocorrem (STAROSZCZYK et al., 2014).

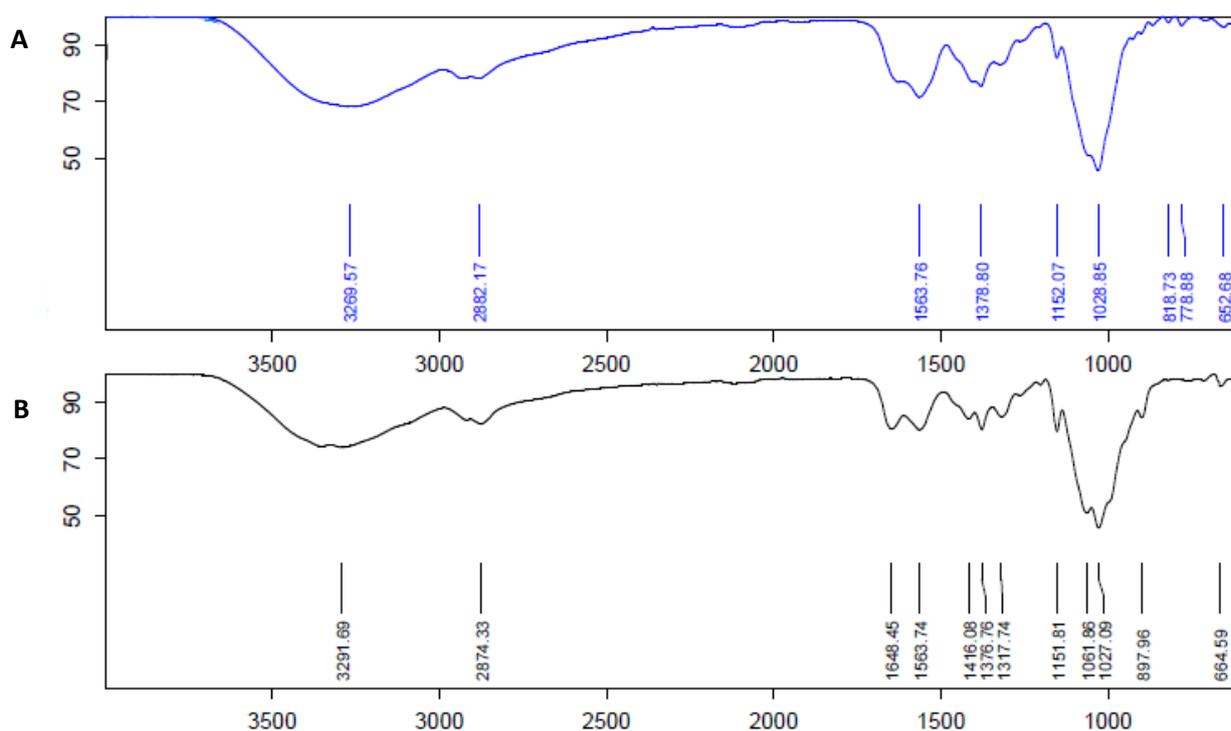
Os picos que foram observados são característicos de filmes à base de quitosana, exibindo bandas correspondente ao estiramento da ligação O-H ($3291,69\text{ cm}^{-1}$) em que a banda é ampla pela sobreposição do N-H (FERREIRA et al., 2014; ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010). Outras bandas também foram observadas: ($2874,33\text{ cm}^{-1}$) relacionada à ligação assimétrica C-H, ($1648,45\text{ cm}^{-1}$) atribuído ao estiramento da ligação C=O, ($1563,74\text{ cm}^{-1}$) correspondente à flexão da amida II, relacionados às vibrações do grupo acetamida (YAVUZ et al., 2010; LIU et al., 2013; FERREIRA et al., 2014; STAROSZCZYK et al., 2014), ($1376,76\text{ cm}^{-1}$) relacionada com as vibrações da estrutura pelo alongamento do grupo C-O, ($1154,81\text{ cm}^{-1}$) relacionada ao estiramento simétrico do grupo C-O-C, ($1027,09\text{ cm}^{-1}$) que é correspondente ao estiramento simétrico do grupo C-O, são característicos da estrutura polissacarídica do polímero (STAROSZCZYK et al., 2014; ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010; YAVUZ et al., 2010). A presença dos grupos acetamidas indicam que a quitosana não foi desacetilada completamente (FERREIRA et al., 2014; STAROSZCZYK et al., 2014).

Quando o EHRA foi incorporado à quitosana, algumas alterações foram percebidas, Bitencourt et al. (2014) atribuíram o deslocamento das bandas à interação entre o polímero e os compostos fenólicos presentes, sendo que também pode ser uma das explicações para o pesquisa atual; além de ter ocorrido uma evidente perturbação entre as bandas referentes à amida III, à amida II, à amida I, podendo sugerir uma interação entre o grupo NH_2 da quitosana com o O-H do EHRA (PRADO et al., 2011), e à região sacarídica, levando a uma descontinuidade estrutural da molécula (STAROSZCZYK et al., 2014) com o desaparecimento de algumas bandas e, conseqüentemente, modificando a matriz de quitosana.

Quanto à presença do grupo funcional OH, este pode estar relacionado à atividade antioxidante da molécula (PERUMALLA e HETTIARACHCHY, 2011), que revelou

potencial de proteção, pois Arora, Nair e Strasburg (1997), perceberam que a substituição do grupo hidroxila dos flavonóides por outros grupos, reduzia a capacidade antioxidante dos mesmos. Por fim, observando as duas estruturas percebe-se que não houve alterações significativas diante as interações químicas que ocorreram.

Figura 2-ATR-FTIR espectro de quitosana/EHRA (A) e quitosana (B)



3.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas estudadas foram tração na ruptura (T_R), alongamento (ϵ_R) e módulo de Young (E) dos filmes com e sem adição do EHRA e estão apresentadas na Tabela 5. A presença do EHRA na matriz filmogênica de quitosana reduziu significativamente a resistência (menor T_R), a flexibilidade (menor ϵ_R) e a rigidez (menor E) dos filmes de quitosana. Essas propriedades caracterizam o filme quanto ao poder de sustentação da película (T_R), à capacidade de estiramento antes de ser rompido (ϵ_R) e quanto à elasticidade da película (KHOSHGOZARAN-ABRAS et al., 2012).

As propriedades mecânicas do filme definem a capacidade de proteger a integridade dos alimentos de danos físicos (MARTINS, CERQUEIRA e VICENTE, 2012; RUBILAR

et al., 2013). A quitosana, devido à sua carga positiva, apresenta uma versatilidade de adesão a superfícies biológicas, sendo capaz de formar materiais estáveis (MORADI et al., 2012), no entanto podem apresentar fragilidade tornando-se necessário a utilização do plastificante, para reduzir o atrito entre as cadeias do polímero e melhorar a flexibilidade da matriz (LECETA et al., 2015; FERREIRA et al., 2014).

Os filmes desenvolvidos neste trabalho foram de fácil retirada das placas, estavam em condições de serem manuseados e analisados, no entanto, os filmes de quitosana contendo 20% (v/v) de EHRA e glicerol 0,20% (v/v) apresentaram baixa tensão de ruptura e taxa de deformação. Esses resultados podem ser explicados pela quantidade de EHRA que foi incorporada, visto que Khoshgozaran-Abras et al. (2012) prepararam filmes à base de quitosana (2,00%, m/m) com diferentes concentrações do gel de *Aloe Vera* e concluíram que o valor de 20% (v/v) incorporados à matriz, representou uma quantidade crítica, pois valores acima repercutiram na redução dos parâmetros analisados (T_R , ϵ_R , E). Entretanto, é importante considerar que a escolha da concentração do extrato da atual pesquisa, foi baseada na capacidade antioxidante apresentada e não nas características mecânicas.

Tabela 5-Efeito da incorporação do extrato hidroetanólico de resíduo da acerola (EHRA) na tração na ruptura (T_R), na elongação (ϵ_R) e no módulo de Young (E) dos filmes à base de quitosana

Filmes	Concentração EHRA (%)	T_R (MPa)	ϵ_R (%)	E (MPa)
Quitosana	0	35,22±2,09 ^a	39,61±0,64 ^a	480,65±3,63 ^a
Quitosana/antioxidante	20	20,54±1,07 ^b	9,11±0,13 ^b	445,52±2,33 ^b

Os valores são apresentados como média e desvio padrão. As médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste “t” de student ($p < 0,05$).

No referente à T_R , valor similar foi encontrado por Martins, Cerqueira e Vicente (2012), para filmes de quitosana (1,50%, m/v), enquanto que Rubilar et al. (2013) encontraram valores superiores para filmes de igual matriz (2,00%, m/v). Em relação à elongação, Rubilar et al. (2013) encontraram valores inferiores. Da mesma forma, Peng e Li (2014) observaram que a adição de óleos essenciais de tomilho, canela e limão, reduziram significativamente o alongamento dos filmes à base de quitosana (2,00%, m/v), enquanto que a T_R não apresentou alterações significativas na maioria dos ensaios. Ademais, Sánchez-González et al. (2010), adicionando óleo essencial de bergamota nos filmes à base de

quitosana (1,00%, m/m), identificaram redução T_R , ϵ_R e E , atribuindo esse resultado à descontinuidade da matriz polimérica após a incorporação do aditivo, conduzindo a uma resposta mecânica mais frágil.

Todos os testes do atual trabalho, apresentaram diferença significativa entre eles, sendo que de uma forma geral, os valores encontrados na literatura, são variáveis, podendo estar relacionado com a composição e quantidade do polímero, com o uso e concentração do plastificante, com a mistura de componentes (PENG E LI, 2014; RUBILAR et al, 2013; MARTINS, CERQUEIRA e VICENTE, 2012; OJAGH et al., 2010), com a preparação e armazenamento do filme, além de que o teor de umidade também pode interferir nessas características, visto que a água pode atuar como plastificante (RUBILAR et al., 2013; OJAGH et al., 2010). Nesse sentido, as moléculas de água atuam interagindo com os grupos polares da quitosana através de pontes de hidrogênio, consequentemente suavizando sua estrutura e aumentando a mobilidade molecular, assim a perda de umidade resulta num filme com maior dureza e menor extensibilidade (LECETA et al., 2015). E como referido anteriormente, os filmes do presente estudo se mostraram relativamente secos, o que pode ajudar na compreensão das particularidades apresentadas.

Razavi, Amini e Zahedi (2015) avaliando o efeito do glicerol nas propriedades mecânicas dos filmes, preparados com goma de semente de sálvia (1,50%, m/v), perceberam que quanto maior a quantidade incorporada do plastificante, menor foi a T_R e maior ϵ_R . Como os plastificantes reduzem a carga eletrostática da estrutura dos polímeros, aumentando a flexibilidade da cadeia, a resistência a fratura e a constante dielétrica, pode-se concluir que também existe um limiar para o plastificante interferir nessas propriedades. Diante disso, a quantidade de plastificante utilizada nesse trabalho, pode não ter influenciado os resultados apresentados.

Outras variáveis também podem influenciar as características mecânicas, como mostrado por Souza et al. (2010), que referiram que o grau de desacetilação e o peso molecular da matriz podem contribuir com a alteração de valores dessas propriedades, relacionando esse fato à cristalinidade dos filmes de quitosana.

3.7 Cinética da atividade antioxidante

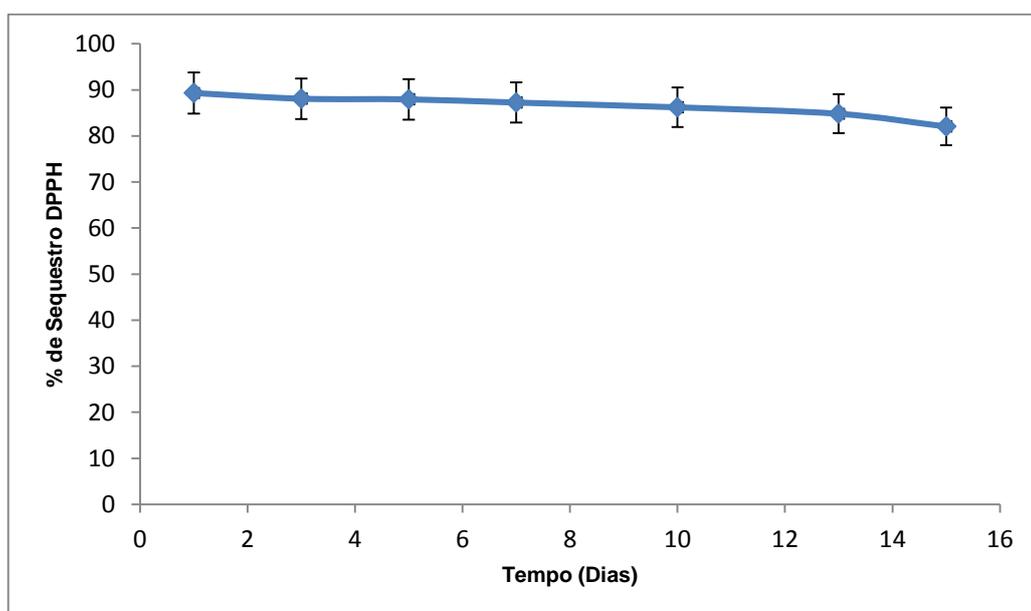
A oxidação é uma das principais causas de deterioração dos alimentos (SIRIPATRAWAN e NOIPHA, 2012; BABBAR et al., 2011; BREWER, 2011), por

issocresce o interesse no desenvolvimento de estratégias que previnam as interferências dos fatores externos e que possam garantir a inocuidade do alimento e as embalagens com propriedades ativas, parecem ser uma boa alternativa de proteção.

O objetivo principal deste trabalho foi formar um novo material biodegradável com propriedades antioxidantes, que pudessem retardar o processo de oxidação de alimentos com propensão a este tipo de deterioração, como carnes, alimentos com alto teor lipídico e outros. A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada extraindo os compostos antioxidantes que permaneceram no filme de quitosana após seu preparo. Tomou-se este cuidado, para garantir a caracterização do material, uma vez que acredita-se que parte dos compostos bioativos podem ser perdidos durante o processamento de obtenção dos filmes.

Para analisar o comportamento da atividade antioxidante, foram desenvolvidos ensaios preliminares, com o intuito de identificar o melhor tempo de agitação (magnética), sob uma velocidade constante de 1000 rpm, para obtenção dos compostos bioativos do filme aditivado. Como os resultados, dentre os ensaios, não apresentaram diferença significativa, foi priorizado a eficiência do processo, optando-se pelo tempo de 1 minuto que mostrou uma maior capacidade de sequestro do radical DPPH (89%).

Figura 3- Atividade de sequestro dos radicais livres do extrato contendo compostos bioativos antioxidantes retirados dos filmes à base de quitosana contendo EHRA.



É importante ressaltar que um dos fatores que determinam a eficiência de um processo é o tempo para ser concluído e, por levar em consideração esse parâmetro, nesse

estudo pensou-se numa proposta de celeridade do processo de obtenção dos compostos presentes no filme. Encontrou-se na literatura estudos que extraíam os compostos dos filmes mantendo as amostras do filme de quitosana imersas em água destilada durante 24 horas (WANG et al., 2013); enquanto que Norajit, Kim e Ryu (2010) submeteram amostras dos filmes à vigorosa agitação por um período de três horas. No entanto, quanto menor o tempo destinado à extração, menor seria a exposição ao oxigênio, conseqüentemente maior a preservação das propriedades do extrato.

Na análise da ação antioxidante durante quinze dias, foi verificado um bom comportamento cinético, conforme mostra a Figura 4. Os resultados foram superiores aos encontrados por Wang et al. (2013), que encontraram valores próximos de 60% nos filmes de quitosana incorporados com 40% (v/v) de polifenóis oriundos de chá, em trinta minutos de estabilização da reação, o mesmo utilizado na atual pesquisa. Os resultados também foram superiores ao obtido por Ferreira et al. (2014) com um percentual de sequestro de, aproximadamente 30% depois de 68 horas de reação.

Portanto, uma atividade de sequestro de DPPH em torno de 85% em 30 minutos de reação, como o encontrado para os filmes de quitosana contendo EHRA foi indicativo de uma ação antioxidante eficiente, sugerindo que o material desenvolvido pode ser um adequado para proteção de alimentos sensíveis ao oxigênio e a luz.

Estudos corroboraram com esse indício, como o estudo de Siripatrawan e Noipha (2012) que analisaram o efeito da aplicação de filmes da mesma matriz, incorporados com extrato de chá verde em carnes de porco, que possuem em sua composição uma quantidade elevada de gorduras insaturadas, e observaram uma conservação por um período de vinte dias, quando comparadas a filmes apenas com o polímero e outro sem proteção alguma. Da mesma forma, Cao et al. (2013) avaliaram o efeito da quitosana pura (0,5% e 1%) e com extrato etanólico de cebola, alho e gengibre (mistura 1=1% Q + 10% do extrato e mistura 2= 0,5% Q + 5% do extrato) e do extrato puro na preservação de carnes de porco refrigeradas (4°C) por um período de 12 dias. E mostraram que a quitosana pura teve atividade antioxidante menor que a do extrato, que o extrato teve uma importante atuação no retardamento da oxidação lipídica e que houve efeitos positivos na preservação do produto com as misturas, referindo um provável efeito sinérgico entre o polímero e os compostos bioativos resultando numa boa atuação antioxidante.

A capacidade antioxidante é definida como a capacidade em retardar, inibir ou evitar a oxidação de materiais oxidáveis por eliminação dos radicais livres, diminuindo o estresse oxidativo (DAI e RUSSELL, 2010). Assim, os antioxidantes têm um importante papel na preservação dos alimentos, principalmente os naturais que além de protegerem o produto, agrega valor à sua composição melhorando e/ou mantendo sua funcionalidade, tornando-se ainda mais relevante por se tratar de subprodutos da agroindústria que sendo desperdiçados, poderiam gerar impacto negativo ao ambiente e à economia e não contribuiria com a lucratividade industrial.

A quantificação de fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, define a capacidade química de redução dos compostos presentes no extrato em relação ao ácido gálico, daí ser expressos em equivalentes dessa substância, porém não é uma medida absoluta das quantidades de compostos fenólicos (PAZ et al., 2015). Esse método baseia-se na redução de um complexo ácido fosfotungstíco e fosfomolibdico, por reação com os compostos fenólicos resultando na coloração azul, que é devida à transferência de elétrons em pH básico (WANG et al., 2013; SIRIPATRAWAN e HARTE, 2010).

Os compostos fenólicos apresentam uma importante função como antioxidante natural, entretanto o conteúdo desses substratos nos filmes dessa investigação, foram baixos (4,04mg/g de filme), entretanto os resultados referentes à atividade antioxidante foram bastante satisfatórios. Essa atividade, geralmente é relacionada a esses compostos (PAZ et al., 2015; BABBAR et al., 2011), no entanto o resultado do presente estudo não foi sugestivo dessa relação. O que corrobora com o estudo de Babbar et al. (2011), que analisaram a correlação entre o teor de compostos fenólicos com a atividade antioxidante de resíduos de seis tipos de frutas, não encontrando uma relação linear para nenhum deles, embora tenha encontrado uma ação antioxidante semelhante a ação do filme desse trabalho no extrato de sementes de lichia (83%) e casca de “knnow” (80%), mostrando que não houve uma relação direta entre compostos fenólicos e a capacidade antioxidante. E esses efeitos podem ser resultantes de interações sinérgicas ou antagônicas entre os constituintes dos resíduos.

Moradi et al. (2012) também encontraram baixos valores na quantificação de fenólicos, incorporando extrato de *Zataria multiflora* em filmes à base de quitosana, revelando uma baixa quantificação (5 à 6 mg de ácido gálico/g filme) e sugeriram uma interferência da hidrofobicidade do óleo. Entretanto, os baixos valores de fenólicos no filme estudado, pode ser atribuído à formação de cromogênios, pela reação do reagente Folin

Ciocalteu com substâncias não fenólicas que podem ser detectadas em espectrofotometria, sabendo que o teor final desses compostos presentes nos filmes, podem ser afetado pela extensão e método de secagem (MORADI et al., 2012; MAYACHIEW e DEVAHASTIN, 2010).

4. CONCLUSÃO

Os filmes de quitosana contendo extrato hidroetanólico de resíduo de acerola (EHRA), como composto bioativo antioxidante, apresentaram coloração tendendo ao vermelho, com características de barreira à luz e de atividade antioxidante (aproximadamente de 89%). Os filmes caracterizaram-se pelo fácil manuseio e desprendimento do suporte de secagem, embora as propriedades mecânicas tenham revelado filmes com menos resistência e elasticidade quando comparado aos filmes de quitosana sem adição de EHRA. Os filmes desenvolvidos apresentaram características valoráveis para a preservação dos alimentos com potencial deterioração oxidativa, sendo viável a produção de uma embalagem com extensão da vida de prateleira do produto alimentício, podendo ampliar a sua aplicabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL WAHAB, M.; ABDU, E. S. Influence of starch and glycerol on the properties of chitosan by positron annihilation spectroscopy. **Journal of applied polymer science**, v. 116, n. 5, p. 2874-2883, 2010.

ANRAKU, M.; FUJII, T.; KONDO, Y.; KOJIMA, E.; HATA, T.; TABUCHI, N.; TOMIDA, H. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 501-505, 2011.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; HERAS, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, 2009.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1997.

ARZATE-VÁZQUEZ, I.; CHANONA-PÉREZ, J. J.; CALDERÓN-DOMÍNGUEZ, G.; TERRES-ROJAS, E.; GARIBAY-FEBLES, V.; MARTÍNEZ-RIVAS, A.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. **Carbohydrate polymers**, v. 87, n. 1, p. 289-299, 2012.

ASTM, D882-10. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual Book of American Standard Testing Methods. Philadelphia:ASTM. 2010.

AYALA-ZAVALA, J. F.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; VEGA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. R175-R181, 2010.

BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; UPPAL, D. S.; PATIL, R. T. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391-396, 2011.

BITENCOURT, C. M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; SOBRAL, P. J. A.; CARVALHO, R. A. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 145-152, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

CAO, Y.; GU, W.; ZHANG, J.; CHU, Y.; YE, X.; HU, Y.; CHEN, J. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1655-1660, 2013.

CASETTARI, L.; GENNARI, L.; ANGELINO, D.; NINFALI, P.; CASTAGNINO, E. ORAC of chitosan and its derivatives. **Food hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 243-247, 2012.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films—A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 175-184, 2012.

CHENG, SIANG-YING; WANG, BE-JEN; WENG, YIH-MING. Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 115-121, 2015.

CRUZ-ROMERO, M. C.; MURPHY, T.; MORRIS, M.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 393-397, 2013.

DA SILVA, L. M. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014.

DAI, JIN; MUMPER; RUSSELL J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN, E.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. S103-S112, 2008.

DANG, KHANH MINH; YOKSAN, RANGRONG. Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 115, p. 575-581, 2015.

DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

ELSABEE, Maher Z.; ABDU, Entsar S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.

ESPINOSA-ANDREWS, H.; SANDOVAL-CASTILLA, O.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; VERNON-CARTER, E. J.; LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 541-546, 2010.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292-303, 2011.

FANG, Y., TUNG, M. A., BRITT, I. J., YADA, S., DALGLEISH, D. G. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 188-193, 2002.

FERREIRA, A. S., NUNES, C., CASTRO, A., FERREIRA, P., COIMBRA, M. A. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 490-499, 2014.

GÓMEZ-ESTACA, J., BRAVO, L., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., ALEMÁN, A., MONTERO, P. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 18-25, 2009.

GÓMEZ-ESTACA, J., LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., CATALÁ, R., & GAVARA, R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 42-51, 2014.

JOUKI, M., YAZDI, F. T., MORTAZAVI, S. A., KOOCHEKI, A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 9-19, 2014.

KHOSHGOZARAN-ABRAS, S., AZIZI, M. H., HAMIDY, Z., BAGHERIPOOR-FALLAH, N. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2058-2062, 2012.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; DE LA CABA, K. Functional properties of chitosan-based films. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 1, p. 339-346, 2013.

LECETA, I., PEÑALBA, M., ARANA, P., GUERRERO, P., DE LA CABA, K. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **European Polymer Journal**, v. 66, p. 170-179, 2015.

LI, J. H., MIAO, J., WU, J. L., CHEN, S. F., ZHANG, Q. Q. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 166-173, 2014.

LIMA, V. L. A. G. D., MELO, E. A., PINHEIRO, I. O., GUERRA, N. B. Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 1, p. 86-92, 2011.

LIU, J., LU, J. F., KAN, J., TANG, Y. Q., JIN, C. H. Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 85-93, 2013.

LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., GÓMEZ-ESTACA, J., CATALÁ, R., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1376-1384, 2012.

MA, W., TANG, C. H., YANG, X. Q., YIN, S. W. Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate–chitosan composite films at acidic pH. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 237-247, 2013.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P., CORTEZ-ROCHA, M. O., EZQUERRA-BRAUER, J. M., GRACIANO-VERDUGO, A. Z., RODRIGUEZ-FÉLIX, F., CASTILLO-ORTEGA, M. M., PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 305-315, 2010.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220-227, 2012.

MAYACHIEW, P; DEVAHASTIN, S. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 594-601, 2010.

MERCALI, G. D., JAESCHKE, D. P., TESSARO, I. C., MARCZAK, L. D. F. Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 853-857, 2013.

MEZADRI, T., VILLAÑO, D., FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S., GARCÍA-PARRILLA, M. C., TRONCOSO, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 21, n. 4, p. 282-290, 2008.

MOO-HUCHIN, V. M., ESTRADA-MOTA, I., ESTRADA-LEÓN, R., CUEVAS-GLORY, L., ORTIZ-VÁZQUEZ, E., Y VARGAS, M. D. L. V., SAURI-DUCH, E. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food chemistry**, v. 152, p. 508-515, 2014.

MOO-HUCHIN, V. M., MOO-HUCHIN, M. I., ESTRADA-LEÓN, R. J., CUEVAS-GLORY, L., ESTRADA-MOTA, I. A., ORTIZ-VÁZQUEZ, E., SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, 2015.

MORADI, M., TAJIK, H., ROHANI, S. M. R., OROMIEHIE, A. R., MALEKINEJAD, H., ALIAKBARLU, J., HADIAN, M. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 477-484, 2012.

NORAJIT, K.; KIM, Ki M.; RYU, G. H. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 377-384, 2010.

NORONHA, C. M., DE CARVALHO, S. M., LINO, R. C., BARRETO, P. L. M. Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with α -tocopherol nanocapsules. **Food chemistry**, v. 159, p. 529-535, 2014.

OJAGH, S. M., REZAEI, M., RAZAVI, S. H., HOSSEINI, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 161-166, 2010.

PATRAS, A., BRUNTON, N. P., O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3-11, 2010.

PAZ, M., GÜLLON, P., BARROSO, M. F., CARVALHO, A. P., DOMINGUES, V. F., GOMES, A. M., DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

PENG, YONG; LI, YUNFEI. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 287-293, 2014.

PERDONES, Á., VARGAS, M., ATARÉS, L., CHIRALT, A. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 256-264, 2014

PEREDA, M., PONCE, A. G., MARCOVICH, N. E., RUSECKAITE, R. A., MARTUCCI, J. F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, 2011.

PERUMALLA, A. V. S., HETTIARACHCHY, N. S. NAVAM S. Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827-839, 2011.

PESCHEL, W., SÁNCHEZ-RABANEDA, F., DIEKMANN, W., PLESCHER, A., GARTZÍA, I., JIMÉNEZ, D., CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.

PRADO, A. G., SANTOS, A. L., PEDROSO, C. P., CARVALHO, T. O., BRAGA, L. R., EVANGELISTA, S. M. Vitamin A and vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres: A calorimetric view. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 106, n. 2, p. 415-420, 2011.

RAZAVI, S. M. A.; AMINI, A. M.; ZAHEDI, Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 290-298, 2015.

REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat science**, v. 98, n. 3, p. 404-419, 2014.

RUBILAR, J. F., CRUZ, R. M., SILVA, H. D., VICENTE, A. A., KHMELINSKII, I., VIEIRA, M. C. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 466-474, 2013.

SAMPAIO, G. R., SALDANHA, T., SOARES, R. A. M., TORRES, E. A. F. S. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1383–1390, 2012

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L., CHÁFER, M., HERNÁNDEZ, M., CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1302-1310, 2011.

SANTACRUZ, S., RIVADENEIRA, C., CASTRO, M. Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 89-94, 2015.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 770-775, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; NOIPHA, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 102-108, 2012.

SOTO, M. L., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 1-27, 2011.

SOUZA, B. W. S., CERQUEIRA, M. A., MARTINS, J. T., CASARIEGO, A., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 330-335, 2010.

STAROSZCZYK, H., SZTUKA, K., WOLSKA, J., WOJTASZ-PAJAŁ, A., KOŁODZIEJSKA, I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 707-712, 2014.

SUNG, S. Y., SIN, L. T., TEE, T. T., BEE, S. T., RAHMAT, A. R., RAHMAN, W. A. W. A., VIKHRAMAN, M. Antimicrobial agents for food packaging applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 110-123, 2013.

WANG, L., DONG, Y., MEN, H., TONG, J., ZHOU, J. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 35-41, 2013.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1801-1812, 1999.

WU, J., CHEN, S., GE, S., MIAO, J., LI, J., ZHANG, Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 42-51, 2013.

YAVUZ, A. G., UYGUN, A., BHETHANABOTLA, V. R. Preparation of substituted polyaniline/chitosan composites by in situ electropolymerization and their application to glucose sensing. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 3, p. 712-719, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de embalagens com potencial ativo, utilizando matérias-primas de origem natural é uma linha de pesquisa bastante promissora para a indústria de alimentos. O presente trabalho foi conduzido com o intuito de produzir um material que possa contribuir com a preservação do ambiente, com o aproveitamento de partes de alimentos que são geralmente descartados, mas que têm valiosas funcionalidades, e com a preservação da qualidade dos alimentos.

A aplicação da técnica do planejamento experimental DCCR possibilitou o desenvolvimento de dezessete ensaios, que foram retirados da superfície plana com facilidade e foram simples de manusear, exceto o de menor concentração, que apresentou características mais frágeis. Todos apresentaram propriedade antioxidante, o que foi importante para o direcionamento de novos ensaios a fim da obtenção de melhores respostas quanto à propriedade antioxidante e retenção de fenólicos. Percebeu-se que a concentração do plastificante não mostrou interferência nessas variáveis. Assim, novos ensaios foram conduzidos, sendo que o filme com a concentração de quitosana de 1,32% (m/v) e 20 mL (v/v) do extrato hidroetanólico do resíduo da acerola, com plastificante fixado em 0,2% (v/v), foi o que apresentou maior potencial antioxidante, e este foi conduzido a outras análises.

Os filmes desenvolvidos para os testes de caracterização apresentaram propriedade de barreira à luz e uma forte atividade antioxidante (89%), mostrando ser viável a sua utilização como embalagens com potencial ativo para proteção dos alimentos. A partir dos resultados obtidos também é possível estimular outros estudos para ampliar ainda mais os conhecimentos da matéria, seja para melhorar a resistência desses filmes, seja para aprofundar-se na definição dos alimentos nos quais o material poderia ser aplicado.

Graças a este estudo foi possível observar que, apesar de uma baixa quantidade de teor de fenólicos que foram quantificados nos filmes (4,04mg/g de filme), obteve-se uma atividade antioxidante maior que 80% durante o período observado de quinze dias. Desta maneira, ficou demonstrada a sua potencialidade na preservação da qualidade e segurança dos alimentos, sendo uma alternativa viável para estender sua validade comercial, assim como para auxiliar a diminuição do desperdício dos mesmos.